

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE À LA
MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
CAROLINE JOLIN**

**L'INTOXICATION CHRONIQUE À L'ACÉTAMINOPHÈNE INDUIT
L'EXPRESSION DES PROTÉINES DE STRESS ET LA RÉORGANISATION
DES PROTÉINES DE FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DANS LES
HÉPATOCYTES CENTROLOBULAIRES DE SOURIS**

AVRIL 2005

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de maîtrise, Mme Monique Cadrin, Ph.D. pour m'avoir permis de travailler sur ce projet ainsi que pour m'avoir permis de participer et de présenter des résultats au congrès de l'ASCB à Washington en décembre 1999. Ce furent des expériences inoubliables et très enrichissantes. J'aimerais aussi remercier Mme Hélène Hovington B.Sc., l'assistante de recherche du laboratoire, qui m'a initié à beaucoup des techniques acquises au cours de ces années. Je tiens particulièrement à remercier mes collègues de laboratoire, Louis Villeneuve, Luc English, Michel Fausther et les autres qui ont été de passage, pour leur amitié, leur aide et les agréables moments passés ensemble.

Je m'en voudrais de passer sous silence l'importance de tous les moments partagés avec mes amis et collègues, Amélie, Anne, Dominic, Fannie, Guillaume, Jean, Julien, Keith, Marie-Guyline, Mélanie, Mylène et tous les autres sans lesquels ces années auraient été beaucoup moins amusantes et stimulantes.

J'aimerais également remercier ma famille, certains amis et collègues de travail, particulièrement Vicky et Monique D., pour leurs nombreux encouragements et leur soutien. Je sais que j'ai du être difficile à vivre par moment...

Je souhaiterais particulièrement remercier Mylène C. Gagnon qui a pris le temps de lire mon mémoire à plusieurs reprises, de corriger plusieurs passages et me faire part de ses commentaires constructifs. Sans ton aide, ce mémoire n'aurait assurément jamais vu le jour.

Enfin, il me serait impossible de terminer sans remercier spécialement M. Pierre Tancrede Ph.D. grâce à qui j'ai pu obtenir le délai me permettant de terminer ma rédaction et M. Marc Beauregard Ph.D. qui m'a permis d'utiliser ses installations pour terminer l'écriture de ce mémoire.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Caroline Jolin et Monique Cadrin ont participé à la conception du projet d'étude et à la rédaction de l'article scientifique présenté dans le présent mémoire. Caroline Jolin a réalisé la totalité des expériences exposées dans le présent travail. Luc English, étudiant au baccalauréat en Biologie médicale, a contribué à l'obtention de certains résultats dans la première partie de ce travail. Pour faire suite à ce travail, une étudiante de notre laboratoire, Anne-Marie Fortier, a récemment réalisé des expériences sur la phosphorylation des kératines.

RÉSUMÉ

L'acétaminophène (ACT), un médicament analgésique et antipyrétique largement utilisé à travers le monde, devient un agent hépatotoxique lorsque utilisé à forte dose. En effet, l'expression de certaines protéines de stress au niveau du foie, soit celle d'Hsp25 et d'Hsp70i, est associée à la toxicité induite par cet agent. Récemment, il a été démontré que K8/K18 ont un rôle à jouer dans la protection des hépatocytes contre les stress mécaniques et toxiques. Aussi, notre étude a montré que lors de l'administration d'ACT, le niveau d'expression des kératines 8 et 18 (K8/K18) ainsi que l'organisation du réseau de filaments intermédiaires (FIs) dans les hépatocytes sont affectés. Dans le présent travail, nous avons voulu examiner la relation entre l'expression et la distribution à travers le foie de ces quatre protéines (Hsp25, Hsp70i, K8 et K18) chez des souris intoxiquées à l'ACT. Pour ce faire, des souris adultes ont été nourries avec une diète contenant 1% p/p d'ACT pour une période de 4 mois. Par immunobuvardage de type Western nous avons étudié le niveau d'expression des Hsps et de K8/K18. Après seulement un mois de traitement, il a été démontré que le niveau d'expression des Hsps 25 et 70i et de K8 et K18 était supérieur à celui des contrôles. La localisation des Hsps et des FIs a, pour sa part, été étudiée par immunofluorescence. Après 1 à 3 mois de traitement, les Hsps 25 et 70i étaient présentes principalement dans les hépatocytes de la zone centrolobulaire. Dans plusieurs de ces mêmes hépatocytes une réorganisation du réseau de FIs était observée. Après un traitement de 4 mois, les Hsps 25 et 70i étaient principalement localisées au niveau de la membrane plasmique et du noyau des hépatocytes étroitement associés aux veines centrolobulaires. Après cette période de traitement, une colocalisation entre les Hsps et les FIs dans certaines cellules était aussi visible. La modification de l'organisation des kératines dans les hépatocytes qui expriment un haut niveau d'Hsps ainsi que la colocalisation de ces deux types de protéines, est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les FIs ont un rôle important à jouer dans la protection des hépatocytes contre les agents toxiques.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
CONTRIBUTION DES AUTEURS	iii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 Le cytoquelette	2
1.1.1 Les filaments intermédiaires	3
1.1.1.1 Structure et assemblage des filaments intermédiaires	5
1.2 Les kératines	8
1.2.1 Les kératines dans le foie	8
1.3 Maladies associées aux filaments intermédiaires	10
1.3.1 Maladies associées aux kératines	11
1.3.1.1 Les maladies de la peau	11
1.3.1.2 Les maladies du foie	14
1.4 Les protéines de stress	15
1.4.1 La famille des Hsp70	17
1.4.2 La famille des petites Hsps	18
1.4.3 Les Hsps et la maladie	19
1.5 Interactions entre les Hsps et les protéines de filaments intermédiaires	21
1.6 L'acétaminophène	24
1.6.1 Structure et fonctions de l'acétaminophène	24
1.6.2 Métabolisme	26
1.6.3 Intoxication des souris à l'acétaminophène	27
1.7 Objectifs de ce projet de maîtrise	29

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	30
2.1 Résumé de l'article	30
2.2 Article scientifique	31
Abstract	32
Introduction	33
Materials and methods	36
Animals and treatment	36
Gel electrophoresis and Western blotting	36
Fluorescence microscopy	37
Results	38
Expression of Hsp25, Hsp70i, and K8 in ACT treated mice livers	38
Localization of Hsp25, Hsp70i and K8/18 during ACT intoxication	38
Discussion	39
Acknowledgements	42
References	43
Figures legends	50
Figures	51
CHAPITRE 3 : CONCLUSION	54
3.1 Discussion	54
3.1.1 Détection de K8, Hsp25 et Hsp70i par immunobuvardage de type Western	54
3.1.2 Localisation de K8, d'Hsp25 et d'Hsp70i par immunohistochimie ...	55
3.2 Conclusion	60
3.3 Perspectives de recherche	60
3.3.1 Traitement à plus long terme	61
3.3.2 Phosphorylation	62
3.3.3 Apoptose	65
3.3.4 Protéines associées aux kératines	65
3.3.5 Études <i>in vivo</i> sur un modèle humain	66
RÉFÉRENCES	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Les protéines des filaments intermédiaires	4
Tableau 1.2 Distribution des kératines dans les tissus	9
Tableau 1.3 Maladies associées à des mutations de gènes de kératines	12

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Représentation schématique de la structure commune des protéines de filaments intermédiaires cytoplasmiques	6
Figure 1.2	Modèle de l'assemblage des filaments intermédiaires	7
Figure 1.3	Filaments intermédiaires dans les hépatocytes d'un foie contrôle	10
Figure 1.4	Foie de souris traitée à la griséofulvine et présentant des corps de Mallory	14
Figure 1.5	Structure de l'acétaminophène	25
Figure 1.6	Structure du N-acétyl-p-benzoquinone-imine	26
Figure 1.7	Métabolisme de l'acétaminophène	27

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

Abréviation	Terme
ACT	Acétaminophène
CMs	Corps de Mallory
DDC	3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
EBS	Épidermolyse bulleuse simple
EH	Hyperkératose épidermolytique
EPPK	Hyperkératose palmoplantaire épidermolytique
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FIs	Filaments intermédiaires
GF	Griséofulvine
GFAP	Protéine fibrillaire gliale acide
GSH	Glutathion
Hsc70	Hsp70 exprimée de façon constitutive
Hsps	Protéines de choc thermique (heat shock proteins)
Hsp70i	Hsp70 inductible
sHsps	Petites Hsps
K8	Kératine 8
NAPQI	n-acétyl- <i>p</i> -benzoquinone-imine
NFs	Neurofilaments
NF-L	Neurofilaments de faible poids moléculaire
NF-M	Neurofilaments de poids moléculaire moyen
NF-H	Neurofilaments de poids moléculaire élevé
Ser79	Sérine 79
TRITC	Isothiocyanate de tétraméthyl rhodamine

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Les protéines de filaments intermédiaires (FIs), dont font partie les kératines, sont des protéines ubiquitaires des cellules des mammifères qui contribuent, entre autres, au maintien de la structure cellulaire. Les protéines de stress (Hsps), sont des protéines dont l'expression dans les cellules est constitutive, c'est-à-dire qu'elles sont exprimées dans des conditions normales dans les cellules; cependant, suite à un stress, l'expression de ces protéines est augmentée. Des modifications au niveau de l'expression de ces deux types de protéines ont été associées à plusieurs maladies (ex : certaines maladies de la peau, des maladies du système digestif, des maladies neurodégénératives, des myopathies, etc.). Au niveau du foie, de tels changements surviennent lors du traitement de souris avec la griséofulvine (GF), une substance hépatotoxique. La toxicité induite par la GF provoque une augmentation de l'expression d'Hsp70i et des kératines 8 et 18 (K8/K18) ainsi qu'un changement dans l'organisation du réseau de FIs dans les hépatocytes (Cadrin *et al.*, 2000; Fausther *et al.*, 2004).

L'acétaminophène (ACT), un médicament analgésique et antipyrétique largement utilisé, est lui aussi un important agent hépatotoxique lorsqu'il est administré à forte dose. Au cours de la dernière décennie, il a été démontré que la toxicité de l'ACT est accompagnée par une augmentation des concentrations d'Hsps hépatiques (Salminen *et al.*, 1997a). Cependant, aucune étude n'avait été réalisée pour déterminer si une intoxication avec l'ACT entraîne des modifications au niveau des FIs. Le présent travail avait pour but de déterminer si une relation existait entre l'expression et la distribution des Hsps (25 et 70i) et des FIs (K8/K18), dans le foie des souris intoxiquées à l'ACT.

Ce mémoire de maîtrise est présenté sous la forme d'un article scientifique. Dans l'introduction, qui servira de mise en contexte, une brève revue des notions concernant

le cytosquelette, les FIs, les kératines et les maladies associées à ces protéines sera effectuée. Les thèmes des Hsps et des maladies impliquant ces protéines y seront aussi traités. Une attention particulière sera portée aux deux familles d'Hsps qui ont été au cœur de notre étude, soit Hsp70 et les petites Hsps (sHsps). L'ACT, son métabolisme et les travaux dans lesquels ce médicament a été utilisé comme agent hépatotoxique y seront finalement décrits. Les hypothèses de recherche, le matériel et les méthodes ainsi que les résultats de mes travaux seront exposés au chapitre 2 qui consiste en l'article scientifique qui sera soumis pour publication dans la revue *Hepatology*. Ce chapitre sera suivi d'une conclusion dans laquelle un bref retour sur les résultats, une discussion et les perspectives d'avenir relatives à ce projet seront présentés.

1.1 LE CYTOSQUELETTE

Le cytosquelette, de toutes les cellules de mammifères, est composé de trois principaux types de fibres, soit les microtubules, les microfilaments d'actine et les FIs (Cadrin *et al.*, 1993; Ku *et al.*, 1999). Il joue un rôle essentiel dans plusieurs processus cellulaires comme l'organisation de la membrane plasmique, le maintien de la forme des cellules, le positionnement des organites dans le cytoplasme des cellules, le transport intracellulaire, le mouvement des chromosomes lors de la division cellulaire, le mouvement des cellules, la protection contre certains stress environnementaux ou la mobilité lors de la différenciation cellulaire et la réparation tissulaire (Avila, 1992; Fuchs et Weber, 1994; Furukawa et Fechheimer, 1997; Ku *et al.*, 1999; Valiron *et al.*, 2001).

Chacun des types de fibres du cytosquelette a un rôle particulier à jouer dans la cellule. Les microtubules, qui ont la forme de tubes cylindriques de 25 nm de diamètre sont composés de protomères de tubuline α et β . Ils sont impliqués entre autre, dans le mouvement des chromosomes au cours de la mitose et de la méiose, dans le transport

intracellulaire et dans les mouvements cellulaires dépendant des cils et des flagelles. Les microfilaments d'actine sont formés de protéines globulaires (actine G) qui polymérisent pour former des filaments (actine F) de 5-8 nm de diamètre. Ils sont principalement impliqués dans la migration cellulaire (agissant comme des pseudopodes), la contraction musculaire, l'organisation des membranes plasmiques et le maintien de la forme cellulaire (Carlier, 1991; Ku *et al.*, 1999). Les FIs sont constitués quant à eux par une grande famille de protéines et forment un réseau de filaments de 10 nm de diamètre. Ils sont nommés ainsi car leur taille est intermédiaire entre les deux autres types de fibres du cytosquelette, soit les microtubules (25 nm) et les microfilaments d'actine (5-8 nm) (Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998; Herrmann et Aebi, 1998; Ku *et al.*, 1999). Puisque certaines protéines de cette famille sont à l'étude dans le présent travail, ce type de fibre est décrit plus en détail dans la section suivante.

1.1.1 Les filaments intermédiaires

Chez l'humain, on reconnaît l'existence de plus de 50 gènes codant pour différentes protéines de FIs qui sont exprimés de façon spécifique dans les différents types cellulaires de presque tous les tissus (Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998; Ku *et al.*, 1999; Herrmann et Aebi, 2000; Yoon *et al.*, 2001). Les FIs constituent environ 1% des protéines totales des cellules. Dans certains cas, comme dans les kératinocytes et les neurones, les FIs comptent pour plus de 85% des protéines totales (Fuchs et Cleveland, 1998).

Les protéines de FIs sont classées en 6 groupes, soit les types I à VI, d'après la similarité de leur séquence en acides aminés (Tableau 1.1). Contrairement aux microtubules et aux microfilaments qui sont présents dans toutes les cellules eucaryotes, les FIs de type I à IV et de type VI se retrouvent dans le cytoplasme de presque toutes

les cellules des organismes supérieurs. Les FIs de type V se retrouvent pour leur part au niveau du noyau (Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998; Herrmann et Aebi, 1998; Ku *et al.*, 1999; Herrmann et Aebi, 2000; Herrmann *et al.*, 2000; Omary *et al.*, 2002).

TABLEAU 1.1
Les protéines des filaments intermédiaires

Localisation	Type	Protéines	Distribution
Cytoplasmique	I	Kératines (K9-K23)	Épithélium
	II	Kératines (K1-K8)	Épithélium
	III	Vimentine	Mésenchyme
		GFAP	Cellules gliales/astrocytes
		Desmine	Cellules myogéniques
		Périphérine	Neurones périphériques
	IV	Neurofilaments (L, M, H)	Neurones
		α -internexine	Neurones du SNC
	VI	Nestine	Cellules souches neuroépithéliales
Nucléaire	V	Lamines	Tous les types de cellules

(Modifié de Ku *et al.*, 1996)

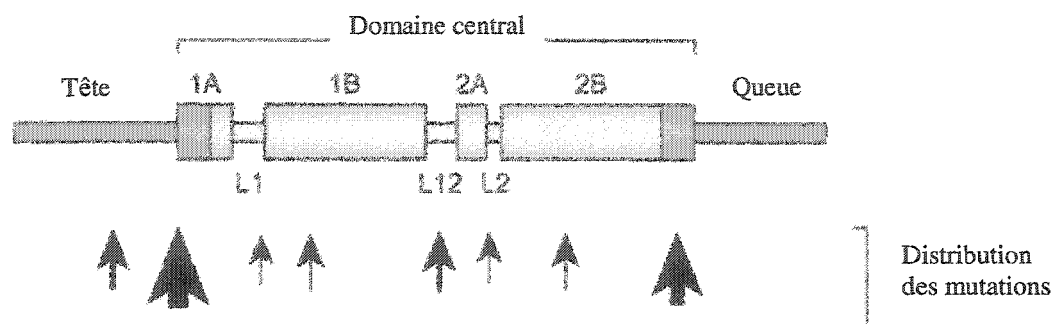
Les protéines de FIs de types I et II, soit les kératines acides et les kératines neutres-basiques, sont présentes dans toutes les cellules épithéliales (Moll *et al.*, 1982). Les FIs de type III comprennent la vimentine, la desmine, la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) et la périphérine. La vimentine est typique des cellules d'origine mésenchymateuse comme les fibroblastes, les adipocytes et les cellules endothéliales alors que la desmine est retrouvée dans les cellules musculaires. Pour ce qui est de la GFAP et la périphérine, elles sont retrouvées dans les cellules gliales et les neurones

périphériques (Fuchs et Weber, 1994; Ho et Liem, 1996; Fuchs et Cleveland, 1998). Les FIs des cellules des systèmes nerveux central et périphérique sont constitués des FIs de type IV, soit les 3 sortes de neurofilaments (NF-L, NF-M et NF-H) et l' α -internexine (Lee et Cleveland, 1996; Al-Chalabi et Miller, 2003). Les FIs de type V, soient les lamines nucléaires (A, B, C), sont présents au niveau de la surface interne des noyaux (Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998; Herrmann et Aebi, 2000; Herrmann *et al.*, 2000; Hutchison *et al.*, 2001). Ils soutiennent la membrane nucléaire et jouent un rôle dans l'organisation de cette membrane et de la chromatine lors de la formation du noyau après la mitose (Fuchs et Weber, 1994). Les lamines fournissent aussi un point d'attachement pour les chromosomes et les pores nucléaires dans les cellules en interphase (Herrmann et Aebi, 2000; Hutchison *et al.*, 2001). La classe de FIs de type VI contient la nestine, une protéine de FIs retrouvée au niveau des cellules souches neuroépithéliales (Herrmann et Aebi, 2000). En raison de la structure du gène, la nestine peut aussi être classifiée avec les neurofilaments (Herrmann et Aebi, 2000).

1.1.1.1 Structure et assemblage des filaments intermédiaires

Les chaînes de toutes les protéines de FIs cytoplasmiques comportent un motif commun : elles possèdent un domaine central en hélices α composé d'environ 310 acides aminés, encadré par un domaine amino-terminal (N_t) et un domaine carboxy-terminal (C_t) non-hélicoïdaux de tailles extrêmement variables. Parmi les différentes classes de FIs, le domaine hélicoïdal central est une région très conservée alors que les domaines N et C terminaux sont très différents tant par leurs tailles que par leurs séquences (Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998; Herrmann et Aebi, 1998, 2000). Le domaine central hautement conservé consiste en un assemblage de quatre hélices α : les segments 1A (35 acides aminés), 1B (101 acides aminés), 2A (19 acides aminés) et 2B (121 acides aminés). Ces hélices sont séparées par trois connecteurs non-hélicoïdaux (L1, L12, L2), de longueur variable (8-22 acides aminés) (Figure 1.1)

(Geisler et Weber, 1982; Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998; Herrmann et Aebi, 1998; Kirfel *et al.*, 2003).

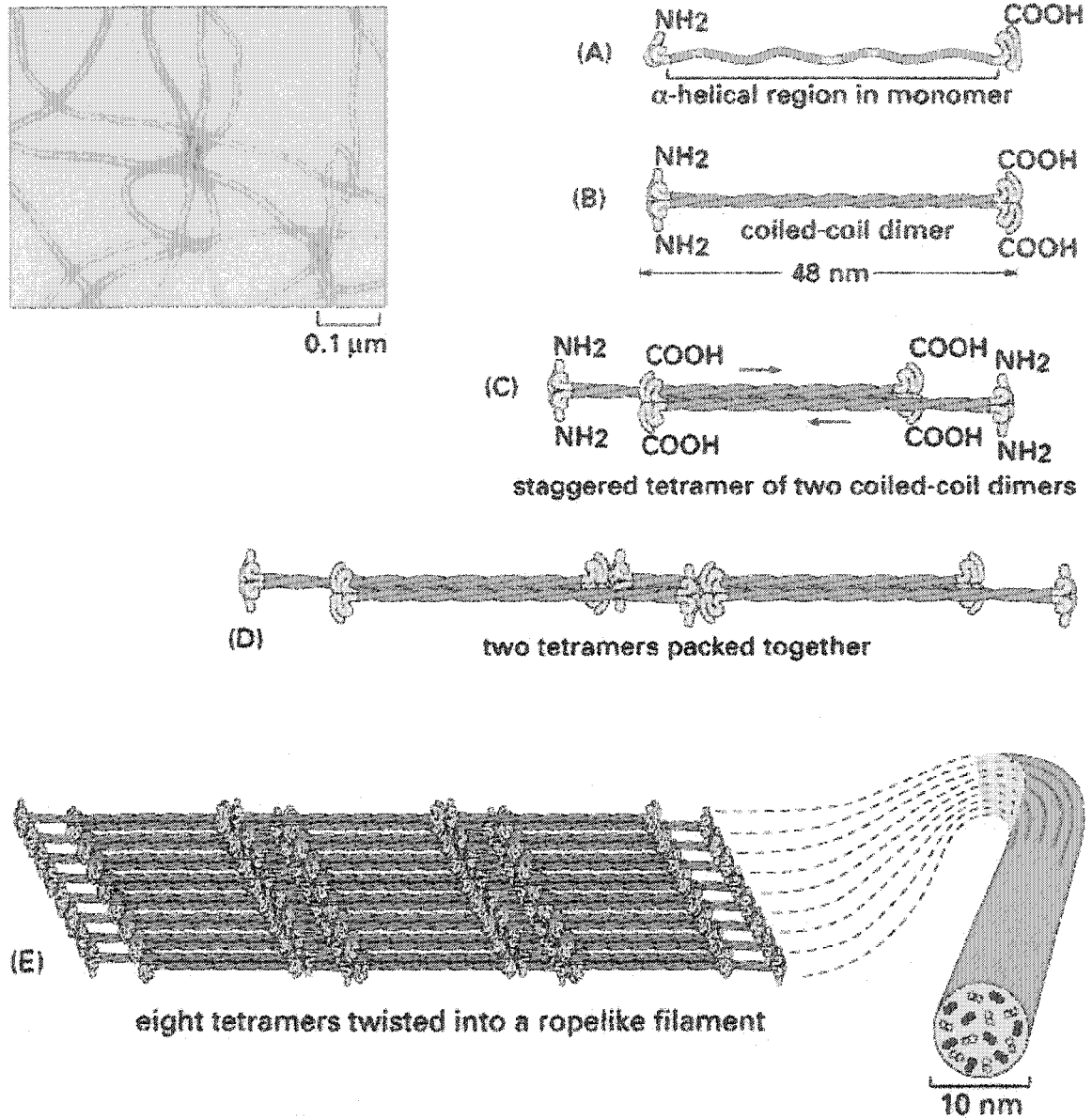


(Modifiée de Coulombe et Omary, 2002)

FIGURE 1.1 Représentation schématique de la structure commune des protéines de filaments intermédiaires cytoplasmiques.

On remarque au centre le domaine central hélicoïdal encadré de chaque côté par un domaine amino-terminal (tête) et un domaine carboxy-terminal (queue) non-hélicoïdaux. Les deux extrémités du domaine central présentent des régions très conservées de 15-20 acides aminés. Plusieurs maladies sont causées par des mutations de ces filaments intermédiaires; les flèches illustrent les sites de mutations fréquents (proportionnel à la taille de la flèche).

Le mode d'assemblage des FIs est encore mal connu. L'hypothèse d'assemblage la plus acceptée impliquerait la formation de dimères suite à l'assemblage de deux monomères de FIs en une hélice parallèle (Herrmann et Aebi, 1998; Coulombe et Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003). Ces dimères pourraient être homopolymériques, comme c'est le cas pour la desmine et la vimentine, ou hétéropolymériques, comme c'est le cas pour les kératines (Herrmann et Aebi, 2000). Deux dimères s'accoleraient ensuite latéralement, de façon antiparallèle pour former un tétramère stable (Herrmann et Aebi, 1998, 2000; Coulombe et Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003). Les détails moléculaires des étapes suivantes de la polymérisation des FIs sont moins bien compris (Kirfel *et al.*, 2003). L'agglomération de huit tétramères en un filament de 10 nm d'épaisseur serait l'ultime étape (Kirfel *et al.*, 2003). Bien que ce modèle d'assemblage des FIs soit un modèle grandement répandu et étudié, jusqu'à maintenant personne n'est arrivé à le confirmer hors de tout doute (Figure 1.2).



(Modifiée de Alberts et al., 2002)

FIGURE 1.2 : Modèle de l'assemblage des filaments intermédiaires

1.2 LES KÉRATINES

Les kératines qui, rappelons-le, font partie des protéines de FIs, représentent une grande famille de protéines constituée d'au moins 50 membres (Fuchs et Weber, 1994; Cadrin et Martinoli, 1995; Omary et Ku, 1997; Fuchs et Cleveland, 1998; Ku *et al.*, 1999; Herrmann et Aebi, 2000; Coulombe et Omary, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Kirfel *et al.*, 2003). Elles sont divisées en deux groupes, soit les kératines acides ou de type I (pKi variant de 4 à 6) et les kératines neutres-basiques ou de type II (pKi variant de 6 à 8) (Moll *et al.*, 1982; Omary *et al.*, 1998; Herrmann et Aebi, 2000; Herrmann *et al.*, 2000; Coulombe et Omary, 2002). Les kératines de type I comprennent les kératines 9 à 23 (K9 à K23) alors que les kératines de type II comprennent les kératines 1 à 8 (K1 à K8) (Fuchs et Weber, 1994; Omary et Ku, 1997; Coulombe et Omary, 2002). Les kératines de type I et de type II s'associent dans une proportion 1 : 1 pour former des hétéropolymères obligatoires qui sont exprimés de façon spécifique dans les différents tissus épithéliaux, suivant les différents stades de développement et de différenciation cellulaire (Tableau 1.2) (Franke *et al.*, 1982; Fuchs *et al.*, 1987; Phillips J., 1988; Steinert et Roop, 1988). La principale fonction reconnue pour le réseau de kératine est la protection des cellules épithéliales contre les stress, qu'ils soient de nature mécanique ou toxique (Fuchs et Coulombe, 1992; Fuchs et Weber, 1994; Omary et Ku, 1997; Fuchs et Cleveland, 1998; Toivola *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; Coulombe et Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003).

1.2.1 Les kératines dans le foie

Les hépatocytes forment un épithélium simple caractérisé par la présence d'une kératine de type I, la K18, et d'une kératine de type II, la K8, qui s'associent pour former les FIs (Omary et Ku, 1997; Magin *et al.*, 1998; Toivola *et al.*, 1998; Ku *et al.*, 1999; Toivola *et al.*, 2000). Ces kératines forment un réseau cytoplasmique complexe qui

s'étend de la région périnucléaire à la membrane plasmique et qui est particulièrement dense autour des canalicules biliaires (Figure 1.3) (Cadrin et Martinoli, 1995; Cadrin *et al.*, 2000).

TABLEAU 1.2
Distribution des kératines dans les tissus

Distribution des kératines dans les épithéliums digestifs	
Hépatocytes	K8/18
Canaux biliaires	K8/19, K7/18*
Pancréas (conduits)	K8/19, K7/18*
Pancréas (acini)	K8/18/19
Intestin grêle	K8/20, K19, K18
Côlon	K8/20, K19, K20
Œsophage	K4/13, K6*
Estomac	K8/18, K19, K20, K7*
Vésicule biliaire	K8/18, K7/19*
Distribution des kératines dans d'autres épithéliums	
Kératinocytes/couche basale	K5/14
Kératinocytes/couche suprabasale	K1/10
Épithélium cicatriciel (hyperprolifératif)	K6/16/17
Épithélium de la cornée	K3/12

* kératines retrouvées en quantité minime

(Modifié de Ku *et al.*, 1999)

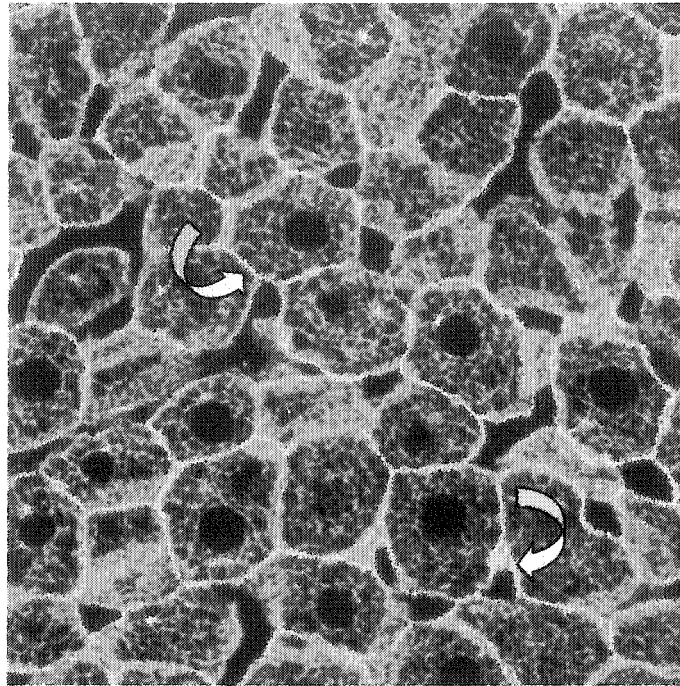


FIGURE 1.3 : Filaments intermédiaires dans les hépatocytes d'un foie contrôle

Dans les hépatocytes, les filaments intermédiaires forment un réseau cytoplasmique qui est plus dense au niveau de la membrane plasmique et des canalicules biliaires (flèches). Mise en évidence des filaments intermédiaires par immunofluorescence.

(Archives personnelles)

1.3 MALADIES ASSOCIÉES AUX FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Un nombre important de pathologies humaines est associé à des modifications des protéines de FIs. Par exemple, plusieurs maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique pourraient être la conséquence de défauts d'assemblage des neurofilaments (NF-H); la formation de cataractes congénitales serait associée à des problèmes reliés à l'expression des protéines de FIs au niveau du cristallin et des myopathies seraient causées par des mutations de la desmine (Capetanaki *et al.*, 1989; Dunia *et al.*, 1990; Carter *et al.*, 1995; Vicart *et al.*, 1998; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999). De récentes études ont aussi démontrées que des mutations des lamines nucléaires A et C seraient responsables de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, le syndrome d'Hutchisson-Gilford, du syndrome de Werner ou encore du désordre de

Charcot-Marie-Tooth (Bonne *et al.*, 1999; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003). Finalement, des mutations des kératines sont reconnues comme étant la cause de plusieurs maladies (Fuchs et Coulombe, 1992; Fuchs et Weber, 1994; Omary et Ku, 1997; Ku *et al.*, 1999; Coulombe et Omary, 2002). La suite de cette section traitera des maladies associées aux kératines.

1.3.1 Maladies associées aux kératines

Plusieurs maladies humaines sont causées par des mutations des kératines. Jusqu'à présent, les mutations d'au moins 18 kératines différentes ont été associées à diverses maladies (Tableau 1.3) (Ku *et al.*, 1996; Omary et Ku, 1997; Fuchs et Cleveland, 1998; Ku *et al.*, 1999; Omary *et al.*, 2002). Les défauts des kératines causant les maladies de la peau et du foie seront décrits plus en détails dans les paragraphes qui suivent.

1.3.1.1 Les maladies de la peau

Le rôle des kératines dans le développement des maladies a été mis en évidence pour la première fois par des travaux sur des souris transgéniques exprimant un gène muté de la K14. Ces souris présentaient des symptômes similaires à ceux observés dans le cas d'une maladie de la peau retrouvée chez l'humain : l'épidermolyse bulleuse simple (EBS) (Vassar *et al.*, 1991). Les mutations associées à cette maladie ont par la suite été retrouvées chez certains patients souffrant d'EBS (Coulombe *et al.*, 1991). Dans cette maladie génétique autosomique dominante assez rare (environ 1/50 000 personne), des mutations sur le gène de la K14 situé sur le chromosome 17 et/ou de la K5 situé sur le chromosome 12, causent la formation d'agrégats de kératine

TABLEAU 1.3
Maladies associées à des mutations de gènes de kératines

Gène de kératine	Maladie	Distribution
K5, K14	Épidermolyse bulleuse simple (EBS)	Épiderme (couche basale)
K1, K10	Hyperkératose épidermolytique (EH)	Épiderme (couche suprabasale profonde)
K2e	Ichtyose bulleuse de Siemens	Épiderme (couche suprabasale superficielle)
K9	Hyperkératose palmoplantaire épidermolytique ou kératoderme palmoplantaire, variante épidermolytique (EPPK)	Épiderme de la paume des mains et de la plante des pieds uniquement (couches suprabasales)
K16, K1	Hyperkératose palmoplantaire non-épidermolytique ou kératoderme palmoplantaire, variante non-épidermolytique	Épiderme de la paume des mains et de la plante des pieds uniquement (couches suprabasales)
K6a, K6b, K16, K17	Pachyonychia congénitale	Ongles et autres épithéliums Stratifiés
K17	Stéatocystome multiplex	Peau
K4, K13	Nævus spongieux oral	Muqueuse buccale (œsophage, et muqueuse anogénitale)
K3, K12	Dystrophie cornéenne de Meesman	Cornée
K8, K18	Prédisposition à développer des maladies chroniques du foie	Épithélium simple

(Tiré de Kirfel et al., 2003)

dans la couche basale des kératinocytes (Coulombe *et al.*, 1991; Fuchs et Coulombe, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998). Le phénotype de cette maladie se traduit par la formation de bulles séreuses lorsque survient un stress mécanique et par une séparation des couches de la peau. Dans les cas sévères d'EBS, les manifestations

cliniques peuvent aussi se produire au niveau des ongles, de la muqueuse orale, de la cornée et de l'œsophage car ces tissus expriment aussi les K14 et K5 (Fuchs et Coulombe, 1992; Fuchs et Weber, 1994; Cadrin et Martinoli, 1995; Fuchs et Cleveland, 1998; Kirfel *et al.*, 2003).

L'hyperkératose épidermolytique (EH) et l'hyperkératose palmoplantaire épidermolytique (EPPK) sont aussi des maladies autosomiques dominantes de la peau. Elles sont causées par des mutations ponctuelles au niveau de certaines kératines empêchant ainsi la formation d'un réseau fonctionnel de FIs dans les cellules épithéliales. L'EH se caractérise par l'amincissement des couches cornée et granulaire de la peau, par la présence d'agrégats de FIs dans la couche suprabasale profonde alors que la couche basale de l'épiderme est normale, et par la formation de bulles séreuses sur la surface de l'épiderme. Le phénotype de l'EPPK ressemble beaucoup à celui de l'EH et il se caractérise aussi par la formation de bulles séreuses mais seulement sous la plante des pieds et la paume des mains (Fuchs et Coulombe, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Fuchs et Weber, 1994; Fuchs et Cleveland, 1998).

Les mutations observées pour ces deux maladies se situent sur les kératines K1 (chromosome 12) et K10 (chromosome 17) pour l'EH et sur la K9 (chromosome 17) pour l'EPPK (Fuchs et Coulombe, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Fuchs et Weber, 1994). Des expériences menées sur des souris transgéniques exprimant le gène d'une K10 modifiée ont démontré que les caractéristiques morphologiques et biochimiques que présentaient ces souris étaient similaires à celles observées chez l'humain (Fuchs *et al.*, 1994; Fuchs et Weber, 1994).

1.3.1.2 Les maladies du foie

Plusieurs pathologies du foie telles l'hépatite alcoolique, la cirrhose amérindienne infantile, la maladie de Wilson, les hépatocarcinomes, l'obésité morbide et l'intoxication aux drogues sont associées à une réorganisation des réseaux de FIs contenus dans les hépatocytes ainsi qu'à la formation de corps de Mallory (CMs), des agrégats contenant des FIs (Figure 1.4) (French S.W., 1987; Jensen et Gluud, 1994a). Selon certaines études, la formation des CMs serait la conséquence de l'augmentation de la synthèse de K8 et/ou de K18 et de la saturation de leur mécanisme de dégradation, ce qui entraînerait leur accumulation dans les hépatocytes (Hutter *et al.*, 1993; Kachi *et al.*, 1993; Cadrin *et al.*, 1995).

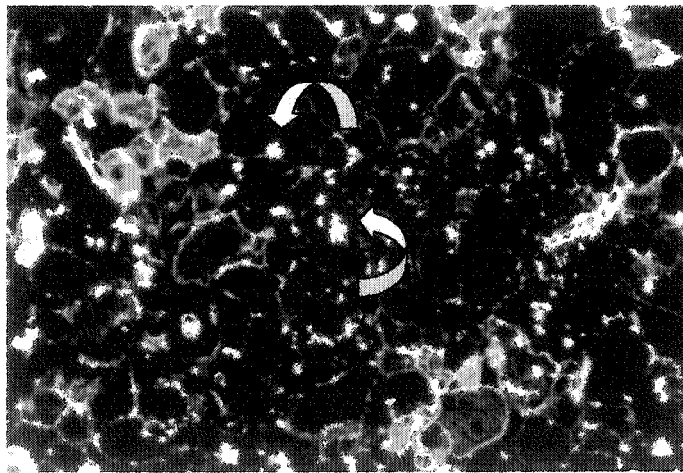


FIGURE 1.4 : Foie de souris traitée à la griséofulvine et présentant des corps de Mallory

Le traitement de souris avec la griséofulvine entraîne la formation de corps de Mallory dans les hépatocytes. Les corps de Mallory sont identifiés par les flèches. Mise en évidence des filaments intermédiaires par immunofluorescence.

(Archives du laboratoire)

Chez la souris, la formation de CMs peut être induite expérimentalement par une intoxication chronique avec des agents hépatotoxiques. Le 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-

dihydrocollidine (DDC) et la griséofulvine (GF) ont déjà été utilisés à cet effet (Denk *et al.*, 1975; Yokoo *et al.*, 1982). Les CMs obtenus dans ces deux cas sont biochimiquement et morphologiquement identiques à ceux retrouvés chez l'humain lors des pathologies du foie mentionnées précédemment (Franke *et al.*, 1979; Cadrin *et al.*, 1990). L'intoxication des souris peut ainsi servir de modèle de travail pour l'étude des phénomènes cellulaires et moléculaires associés à la formation des CMs dans les hépatocytes.

1.4 LES PROTÉINES DE STRESS

Les protéines de stress (Hsps pour « Heat Shock Proteins » ou protéines de choc thermique) représentent un groupe de protéines ubiquitaires très conservées à travers les espèces (Lindquist et Craig, 1988; Schlesinger, 1990; Feder et Hofmann, 1999; Whitley *et al.*, 1999). Elles ont été découvertes au début des années 60 dans des cellules de *Drosophile* exposées à un choc thermique (Ritossa, 1962; Tissieres *et al.*, 1974). Ces protéines sont retrouvées dans presque tous les types de cellules, incluant les procaryotes et les eucaryotes (levures, plantes, mammifères) et dans tous les compartiments cellulaires (Lindquist et Craig, 1988; Schlesinger, 1990; Parsell et Lindquist, 1993; Morimoto *et al.*, 1997).

Les Hsps sont divisées en plusieurs grandes familles selon leur poids moléculaire respectif, leur compartiment cellulaire, leur structure et leur fonction. On retrouve 6 principales familles d'Hsps, soit les Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 et les petites Hsps (sHsps), incluant dans ce sous-groupe les protéines α -cristallines et les Hsps de 12 à 30 kDa, plus particulièrement Hsp25 (Lindquist et Craig, 1988; Schlesinger, 1990; Parsell et Lindquist, 1993; Liang et MacRae, 1997; Morimoto *et al.*, 1997; Agashe et Hartl, 2000). Dans chacune de ces familles d'Hsps, des formes constitutives et des

formes induites par le stress sont retrouvées (Parsell et Lindquist, 1993; Whitley *et al.*, 1999).

Les Hsps fonctionnent comme des chaperons moléculaires, c'est-à-dire qu'elles veillent sur les protéines en se liant à elles (Pelham, 1986; Ellis, 1987). Dans les cellules normales, les Hsps assurent plusieurs fonctions. En s'associant aux protéines en cours de synthèse et aux protéines natives, elles les protègent de l'environnement polaire du milieu cellulaire et facilitent leur repliement. Elles font de même avec les protéines dénaturées, les aidant à se replier en prévenant l'agrégation de leurs parties hydrophobes (Parsell et Lindquist, 1993; Hartl et Martin, 1995; Agashe et Hartl, 2000; Morange, 2000; Slavotinek et Biesecker, 2001; Walter et Buchner, 2002). Les Hsps coordonnent également l'assemblage et le transport des protéines vers les différents compartiments cellulaires, elles contrôlent le passage des protéines d'une conformation active à inactive et vice-versa et enfin, elles ciblent certaines protéines endommagées et préviennent les interactions incorrectes qui pourraient se produire parmi ces protéines non natives (Lindquist et Craig, 1988; Parsell et Lindquist, 1993; Hartl, 1996; Liang et MacRae, 1997; Feder et Hofmann, 1999; Jaattela, 1999; Whitley *et al.*, 1999; Agashe et Hartl, 2000; Slavotinek et Biesecker, 2001).

En réponse à un stress environnemental ou physiologique (ex : choc thermique, infection virale ou bactérienne, ischémie, anoxie, substances toxiques, stress chirurgical, inflammation, fièvre, cancer, rayons UV, etc.), les formes induites de certaines Hsps sont surexprimées dans les cellules (Morimoto *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 1997; Whitley *et al.*, 1999). Le rôle majeur de ces protéines suite à un stress est de catalyser le repliement des protéines dénaturées. Elles ciblent aussi les protéines trop endommagées par le stress et les empêchent de se replier afin qu'elles puissent être dégradées (Pelham, 1986; Parsell et Lindquist, 1993; Hayes et Dice, 1996; Whitley *et al.*, 1999; Slavotinek et Biesecker, 2001; Nollen et Morimoto, 2002). Tous les stress connus, s'ils sont

suffisamment intenses, induisent la production d'Hsps (Feder et Hofmann, 1999; Sharp *et al.*, 1999), d'où leur nom de protéines de stress.

Il a été démontré que le niveau d'expression des Hsps 70 et des petites Hsps dans les hépatocytes est augmenté chez la souris intoxiquée à l'ACT (Salminen *et al.*, 1997a, 1998; Sumioka *et al.*, 2004). Pour cette raison, ces deux familles de Hsps font l'objet de la présente étude et seront donc traitées plus en détails dans le reste de cette section.

1.4.1 La famille des Hsp70

La famille des Hsp70 est sans doute la famille d'Hsps la mieux conservée au cours de l'évolution et la plus étudiée (Jaattela, 1999; Whitley *et al.*, 1999). Les protéines de ce groupe présentent environ 50% d'homologie entre elles et peuvent se retrouver dans les divers compartiments cellulaires (Parsell et Lindquist, 1993; Agashe et Hartl, 2000). Certaines des protéines de cette famille sont exprimées dans des conditions normales dans les cellules, Hsp70 constitutive ou Hsc70, alors que d'autres sont strictement exprimées lors d'un stress, Hsp70 induite ou Hsp70i (Parsell et Lindquist, 1993; Liang et MacRae, 1997; Whitley *et al.*, 1999). Hsp70i, aussi connu sous le nom d'Hsp72, est la principale Hsp induite (Sharp *et al.*, 1999).

Dans les cellules, Hsp70 se lie aux protéines en cours d'élongation, aux protéines nouvellement synthétisées, aux protéines qui ont été dirigées vers le mauvais compartiment cellulaire, à certaines protéines mutées, à certaines sous-unités protéiques exprimées en l'absence de leur partenaire, à des protéines dénaturées ainsi qu'aux petits peptides (Parsell et Lindquist, 1993; Martin et Hartl, 1997). Hsp70 est aussi impliquée dans plusieurs activités cellulaires telles que la translocation membranaire, la réorganisation des composantes du cytosquelette, le transport des protéines nucléaires,

l'assemblage des ribosomes et la synthèse de l'ADN (Parsell et Lindquist, 1993; Salminen *et al.*, 1996; Tosi *et al.*, 1997; Jaattela, 1999; Nollen et Morimoto, 2002; Walter et Buchner, 2002). Lorsque les protéines dénaturées sont altérées de manière irréversible, Hsp70 a pour rôle de les diriger vers les systèmes de dégradation cellulaire (Parsell et Lindquist, 1993; Slavotinek et Biesecker, 2001; Nollen et Morimoto, 2002).

1.4.2 La famille des petites Hsps

Les petites Hsps (sHsps) sont des protéines de moins de 30 kDa et de composition en acides aminés très variable (Parsell et Lindquist, 1993; Perng *et al.*, 1999a). Cette famille d'Hsps est la moins bien conservée à travers les espèces (Michaud et Tanguay, 2003). Au moins 10 sHsps sont connues chez l'humain (Kappe *et al.*, 2001; Kappe *et al.*, 2003). Celles-ci sont généralement exprimées de façon constitutive et parfois même à des niveaux assez élevés (Kato *et al.*, 1991; Iwaki *et al.*, 1994; Nicholl et Quinlan, 1994; Wisniewski et Goldman, 1998). Parmi toutes les sHsps, seulement deux, soit l'Hsp27 (Hsp25 chez la souris) et l' α B-cristalline, sont inductibles par le stress (Kato *et al.*, 2002; Mounier et Arrigo, 2002).

Contrairement aux protéines de la famille des Hsp70, les sHsps ne veillent pas au repliement des protéines dénaturées; elles les protègent de l'agrégation en se liant à elles jusqu'à ce que les conditions soient favorables pour que d'autres chaperons puissent le faire (Slavotinek et Biesecker, 2001; Giese et Vierling, 2004). Le niveau cellulaire des sHsps augmente particulièrement lors de la méiose, lors de la croissance cellulaire, lors de la différenciation et lors de la transcription (Perng *et al.*, 1999a; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999; van den Ijssel *et al.*, 1999; Michaud et Tanguay, 2003). Les sHsps sont également impliquées dans la protection du cytosquelette et la modulation des processus apoptotiques (Lavoie *et al.*, 1993; Bruey *et al.*, 2000; Charette *et al.*, 2000; Mounier et Arrigo, 2002).

1.4.3 Les Hsps et la maladie

Étant donné que l'expression des Hsps est induite lors de stress, il est facile d'imaginer qu'elles ont un rôle important dans plusieurs processus pathologiques (Slavotinek et Biesecker, 2001). Habituellement, les taux d'Hsps s'élèvent en réponse à une accumulation de protéines de structure anormale ayant tendance à s'agréger, lesquelles sont souvent la cause ou la conséquence de maladies (Morange, 2000). Des niveaux élevés d'Hsps ont effectivement été trouvés dans un grand nombre de pathologies dont l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, dont celles causées par des répétitions de polyglutamine, certaines maladies cardiaques et les cancers (Morimoto *et al.*, 1997; Whitley *et al.*, 1999).

La pathogenèse des maladies neurodégénératives (telles la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alexander, les maladies à prions et les maladies caractérisées par des répétitions de polyglutamine dans certaines protéines, par exemple la maladie d'Huntington et l'ataxie spinocérébelleuse) résulterait d'un mauvais repliement de certaines protéines, ce qui causerait un réarrangement conformationnel et leur agrégation. L'agrégation des protéines serait suivie par leur dépôt dans les tissus et par une dégénérescence cellulaire (Kakizuka, 1998; Chan *et al.*, 2000; Kazemi-Esfarjani et Benzer, 2000). L'expression des Hsps au cours de ces pathologies permettrait de minimiser la formation d'agrégats et de stabiliser les protéines dénaturées, ce qui réduirait la toxicité cellulaire reliée à leur précipitation (Cummings *et al.*, 1998).

Dans le processus cancéreux, le rôle des Hsps s'explique par le fait qu'elles assurent un grand nombre de fonctions dans le développement cellulaire (Jaattela, 1999; Kawanishi *et al.*, 1999). Si on les compare avec des cellules normales, les cellules qui ont perdu leur habilité à réguler la croissance cellulaire, comme les cellules tumorales,

expriment souvent de hauts niveaux d'Hsps (Jaattela, 1999). Parmi les 6 familles d'Hsps, il a été démontré qu'Hsp27 et Hsp70, exprimées préférentiellement et abondamment dans les tumeurs malignes, sont très étroitement associées à ce processus cancéreux (Jaattela, 1999; Kawanishi *et al.*, 1999). Malgré le fait que l'on puisse croire que les Hsps auraient dans ce cas-ci une fonction protectrice en inhibant la propagation du cancer, c'est l'inverse qui semble se produire. En effet, certaines études suggèrent qu'Hsp70 et qu'Hsp27 augmentent le potentiel de tumorigénèse des cellules de rongeurs syngéniques, et ce, probablement à cause de leur capacité d'inhiber les processus de mort cellulaire en limitant l'accumulation de protéines anormales dans les cellules (Jaattela, 1995; Garrido *et al.*, 1998; Jaattela, 1999). Les cellules tumorales n'étant pas détruites, la tumeur continue à se développer.

Les Hsps sont aussi impliquées dans le développement de maladies auto-immunes (Winfield, 1989). Effectivement, des anticorps contre les Hsps ont été détectés chez des patients souffrant de maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux (Minota *et al.*, 1988a; Minota *et al.*, 1988b; Tsoulfa *et al.*, 1989a; Tsoulfa *et al.*, 1989b). Dans les deux cas, une réponse immunitaire serait engagée par un mimétisme moléculaire entre les Hsps microbiennes, plus spécifiquement entre une Hsp65 présente chez l'espèce *Mycobacterium*, et celles des patients; les Hsps humaines étant considérées par les cellules T comme des antigènes (Bahr *et al.*, 1988a; Bahr *et al.*, 1988b; Minota *et al.*, 1988a; Minota *et al.*, 1988b; Tsoulfa *et al.*, 1989a; Tsoulfa *et al.*, 1989b).

Dans d'autres cas, par contre, il semblerait que des défauts au niveau même des Hsps soient la cause, ou une des causes, de la pathologie. En effet, certaines maladies comme la cataracte congénitale, la myopathie dite à surcharge en desmine et la maladie de Charcot-Marie-Tooth, semblent directement ou en partie causées par des mutations sur les Hsps (Litt *et al.*, 1998; Vicart *et al.*, 1998; Evgrafov *et al.*, 2004). Une mutation sur l' α A-cristalline ou l' α B-cristalline, deux sHsps, serait associée à la cataracte chez

l'humain (Carter *et al.*, 1995; Litt *et al.*, 1998); une mutation sur l' α B-cristalline serait la cause de certaines myopathies, comme celle avec surcharge en desmine (Vicart *et al.*, 1998); finalement, une mutation sur le gène d'Hsp27 causerait la maladie de Charcot-Marie-Tooth, une maladie neurologique évolutive des nerfs périphériques (Evgrafov *et al.*, 2004). Dans les deux derniers cas, des mutations sur des protéines de FIs sont impliquées, parallèlement avec celles des Hsps, dans la maladie (Carter *et al.*, 1995; Vicart *et al.*, 1998; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999; De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2002; Evgrafov *et al.*, 2004). Ces mutations, des Hsps ainsi que des protéines de FIs, font que l'intégrité du réseau de FIs n'est pas maintenue dans les cellules, ce qui cause la formation d'agrégats qui eux, conduisent éventuellement à la mort cellulaire (Quinlan et Van Den Ijssel, 1999).

Les connaissances actuelles nous permettent difficilement de déterminer hors de tout doute, si l'activité des Hsps dans les cellules au cours du processus pathologique est la cause ou la conséquence des maladies. Néanmoins, il est clair que ces protéines sont très importantes pour le maintien de l'intégrité cellulaire (Liang et MacRae, 1997). Puisqu'il s'avère que les Hsps sont exprimées de façon plus importante lors d'un stress et qu'il est reconnu que la conformation des réseaux protéiques de FIs, une des trois composantes du cytosquelette, subit des remaniements dans les cellules lors de conditions pathologiques, il pourrait être intéressant d'établir une relation entre l'expression et la distribution de ces protéines lors d'une affection donnée. Dans la section qui suit, les interactions connues entre l'expression des Hsps et celle des FIs lors de diverses maladies seront exposées.

1.5 INTERACTIONS ENTRE LES HSPS ET LES PROTÉINES DE FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Les Hsps de plusieurs familles semblent pouvoir interagir avec les différentes protéines composant le cytosquelette (Leicht *et al.*, 1986; Fostinis *et al.*, 1992; Nicholl et

Quinlan, 1994; Czar *et al.*, 1996). Par exemple, des études démontrent qu'Hsp90 et qu'Hsp100 s'associent avec les microfilaments d'actine (Koyasu *et al.*, 1986); qu'Hsp70 se lie et stabilise les microfilaments d'actine et qu'elle semble avoir une affinité particulière pour les microtubules (Weller, 1988; Macejak et Luftig, 1991); et que les membres de la famille des sHsps exercent probablement une plus grande influence sur les microfilaments d'actine que les autres chaperons moléculaires (Liao *et al.*, 1995a). Comme ce travail de recherche se concentre sur les kératines, des protéines de FIs, le reste de cette section sera consacrée à leurs interactions possibles avec les Hsps.

L' α A-cristalline et l' α B-cristalline sont des protéines abondamment exprimées dans le cristallin. Contrairement à l' α A-cristalline, l' α B-cristalline est aussi exprimée dans plusieurs autres tissus, particulièrement dans les muscles squelettiques (Litt *et al.*, 1998). Dans la protéine α A-cristalline, la substitution d'une arginine par une cystéine à la position 116 est la cause d'une cataracte congénitale. La substitution d'une arginine par une glycine à la position 120 de la protéine α B-cristalline peut aussi causer une cataracte; cependant, cette mutation est principalement la cause d'une myopathie avec surcharge en desmine (Vicart *et al.*, 1998; van den Ijssel *et al.*, 1999). Toutefois, comme mentionné dans la section 1.3, ces deux maladies peuvent aussi être causées par des défauts des protéines de FIs. Les cataractes congénitales sont associées à des problèmes d'expression ou des mutations de la vimentine, de la filensine ou de la protéine CP49, des protéines apparentées aux protéines de FIs (Capetanaki *et al.*, 1989; Dunia *et al.*, 1990; Alizadeh *et al.*, 2004). Les myopathies avec surcharge en desmine pourraient quant à elles être causées par la mutation de cette protéine (Vicart *et al.*, 1998). Ces deux maladies se caractérisent par la présence d'une agrégation des FIs dans les muscles ou le cristallin (Goebel et Bornemann, 1993; Perng *et al.*, 1999b). Des biopsies musculaires de patients atteints de myopathies avec une surcharge en desmine révèlent la présence d' α B-cristalline dans les agrégats de desmine (van den Ijssel *et al.*, 1999). Ces observations confirment des données antérieures montrant que les sHsps interagissent avec les FIs, dans des conditions normales et dans des conditions pathologiques (Goldfarb *et al.*, 1998; Munoz-Marmol *et al.*, 1998). Ces résultats

semblent identifier les FIs comme une cible physiologique pour l'activité des sHsps (Sugiyama *et al.*, 2000).

En plus des myopathies liées à une surcharge en desmine et des cataractes congénitales, d'autres maladies telles que la maladie d'Alexander (Iwaki *et al.*, 1989) et les hépatites induites par des drogues (Lowe *et al.*, 1992) sont caractérisées par la présence d'agrégats de FIs. Ces agrégats sont typiquement co-associés avec l' α B-cristalline en dépit du fait qu'ils impliquent des protéines de FIs différentes, soit la protéine fibrillaire GFAP et la vimentine pour la maladie d'Alexander et les kératines et Hsp27 pour les maladies hépatiques (Perng *et al.*, 1999a; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999). Ces études suggèrent donc que l'association de l' α B-cristalline avec les agrégats de FIs est indépendante du type de protéines de FIs. Cette association pourrait, entre autre, se produire en réponse à un réarrangement pathologique des FIs. Cependant, le mécanisme de l'agrégation des FIs et le rôle des sHsps dans ce processus est encore à élucider (Goldfarb *et al.*, 1998; Munoz-Marmol *et al.*, 1998).

Les études énumérées ci-haut tendent à prouver que les Hsps et les FIs sont des protéines qui agissent en collaboration. Lors de ces études, il a été prouvé que dans des conditions de stress pathologiques les Hsps colocalisaient avec les réseaux de FIs dans les cellules. Dans le présent travail de recherche, la relation entre les Hsps et les FIs dans le cadre d'un stress toxique, soit par l'administration chronique d'ACT à des souris, sera étudiée. La dernière partie de cette introduction traitera donc de cette molécule, de son métabolisme et des travaux dans lesquels ce médicament a été utilisé comme agent hépatotoxique.

1.6 L'ACÉTAMINOPHÈNE

Au cours des dernières années, notre laboratoire a acquis une expertise dans l'étude des effets d'une intoxication chronique des hépatocytes de souris (Cadrin *et al.*, 2000; Fausther *et al.*, 2004). Les récents travaux de recherche de Michel Fausther, M.Sc. consistaient, entre autres, à étudier l'expression des Hsp70 parallèlement aux changements d'organisation et d'expression des FIs dans le foie suite au traitement de souris avec la GF (Fausther *et al.*, 2004). Les résultats de ces travaux nous ont permis de confirmer que la GF induit la production d'Hsp70 tout en provoquant la formation de CMs. En plus de la GF, plusieurs autres agents hépatotoxiques, tels le bromobenzène, la cocaïne et l'ACT, sont reconnus pour leur capacité à induire l'expression d'Hsps au niveau du foie (Maruyama et Williams, 1988; Krahenbuhl, 1999; Draganov *et al.*, 2000; Farrell, 2002; Association des pharmaciens du Canada, 2003). Cependant, la relation entre l'expression des Hsps et les changements au niveau des FIs lors de telles intoxications n'a pas été établie. La démonstration des effets combinés d'une intoxication à la GF sur les Hsps et les FIs nous a amenés à se demander si l'intoxication par cet hépatotoxique était un cas isolé ou si des résultats comparables pouvaient être obtenus lors d'autres types d'intoxications. Dans le présent travail, l'ACT a été utilisé pour étudier l'éventuelle relation entre l'expression et la distribution des Hsps (25 et 70) hépatiques et la conformation des FIs, soit les K8 et K18, chez les souris intoxiquées. Dans les sections suivantes, les fonctions de cette substance hépatotoxique, son métabolisme et une revue de son effet sur la souris seront exposés.

1.6.1 Structure et fonctions de l'acétaminophène

L'ACT est une molécule de poids moléculaire de 151,16 g/mole ayant la formule suivante : $C_8H_9NO_2$ (figure 1.5). Aussi connu sous le nom de paracétamol, 4-hydroxyacétylanilide, N-acétyl-p-hydroxyacétylanilide et n-acétyl-p-aminophénol,

l'ACT est un médicament très utilisé à travers le monde comme analgésique et antipyrétique pour le traitement de douleurs légères à modérées et de la fièvre (Lefebvre, 1999; Association des pharmaciens du Canada, 2003). Ce médicament, disponible sans ordonnance depuis 1960, ne possède aucune propriété anti-inflammatoire contrairement à l'acide acétylsalicylique (Aspirine^{MD}) ou à l'ibuprofène (Advil^{MD}) (Davidson et Eastham, 1966; Prescott *et al.*, 1971; Association des pharmaciens du Canada, 2003). À des concentrations thérapeutiques, l'ACT est généralement dépourvu d'effets secondaires; par contre, à forte dose, ce médicament est hépatotoxique (Lefebvre, 1999; Farrell, 2002). L'ACT est un des médicaments les plus souvent associé à des empoisonnements, accidentels ou volontaires, tant au Canada qu'aux États-Unis; les conséquences d'une hépatotoxicité due à l'ACT peuvent même être fatales (Farrell, 2002; Association des pharmaciens du Canada, 2003). Les doses thérapeutiques maximales d'ACT sont de 4 g/jour chez l'adulte et de 2,6 g/jour ou 65 mg/kg chez l'enfant (Krahenbuhl, 1999; Draganov *et al.*, 2000; Farrell, 2002; Zhao et Slattery, 2002; Association des pharmaciens du Canada, 2003). La dose toxique est de $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 24 \text{ heures}^{-1}$ ou approximativement 7 g chez l'adulte; toutefois la quantité nécessaire pour induire une toxicité chez les personnes alcooliques, souffrant de maladies hépatiques ou sous-alimentées est moindre puisque l'induction de certaines enzymes provoquée lors de ces conditions pathologiques nuit au métabolisme normal de l'ACT (Reicks *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1990; Lores Arnaiz *et al.*, 1995; Bergman *et al.*, 1996; Krahenbuhl, 1999; Farrell, 2002; Association des pharmaciens du Canada, 2003; Morimitsu *et al.*, 2004).

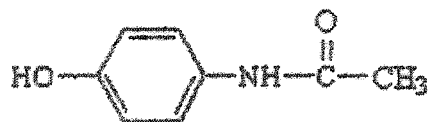


FIGURE 1.5 : Structure de l'acétaminophène

1.6.2 Métabolisme

L'ACT est métabolisé à 95% par les enzymes hépatiques glucoronosyltransférase et sulfotransférase en 2 métabolites inactifs : l'acétaminophène glucuronide et l'acétaminophène sulfate. Le 5% restant est métabolisé grâce au cytochrome p450 dépendant du glutathion en N-acétyl-*p*-benzoquinone-imine ou NAPQI, un métabolite extrêmement toxique (figure 1.6) (Association des pharmaciens du Canada, 2003).

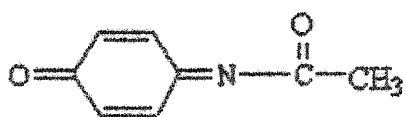
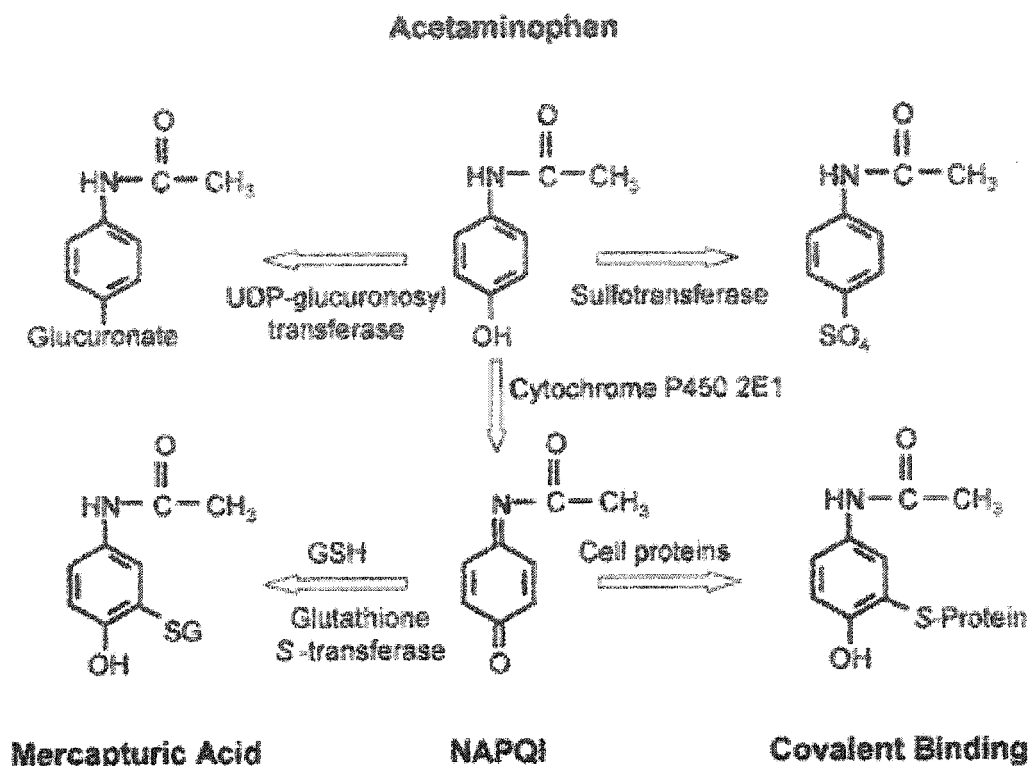


FIGURE 1.6 : Structure du N-acétyl-*p*-benzoquinone-imine

Normalement, lorsque l'ACT est administré à une dose thérapeutique, le glutathion se conjugue rapidement au NAPQI et l'inactive (Figure 1.7) (Farrell, 2002). Lorsque la dose recommandée est dépassée, la réserve cellulaire de glutathion s'épuise rapidement et le NAPQI se fixe alors à d'autres protéines et à la bicouche de lipides des hépatocytes (Bartolone *et al.*, 1992; Pumford *et al.*, 1992; Bulera *et al.*, 1995; Halmes *et al.*, 1996; Pumford *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 1997a). Bien qu'il semble exister de nombreuses cibles pour le NAPQI, la liaison de ce dernier avec des protéines particulières semble jouer un rôle dans la mort cellulaire. Les « acetaminophen binding liver proteins » de 44 kDa et de 58 kDa, la « selenium binding protein » de 56 kDa et la glutamate deshydrogénase sont des exemples de protéines auxquelles le NAPQI s'associerait de façon nuisible (Reicks et Hathcock, 1984; Krahenbuhl, 1999; Farrell, 2002; Sumioka *et al.*, 2004). En effet, la fixation du NAPQI à ces protéines entraîne leur dénaturation, ce qui conduit à une nécrose hépatique centro-lobulaire et finalement, à une insuffisance hépatique (Salminen *et al.*, 1997a, 1997b, 1998).



(Tirée de Krahenbuhl, 1999)

FIGURE 1.7 : Métabolisme de l'acétaminophène

1.6.3 Intoxication des souris à l'acétaminophène

De récentes études ont montré que l'administration de substances hépatotoxiques comme la cocaïne, le tétrachlorure de carbone, le bromobenzène, le cadmium et l'halothane, entraîne une augmentation de l'expression des Hsps dans les hépatocytes de souris (Salminen *et al.*, 1997a, 1997b, 1998). Des études de Salminen et de ses collaborateurs (Salminen *et al.*, 1997a) ont établi que l'ACT entraîne lui aussi une augmentation de l'expression hépatique de certaines Hsps (Hsp25 et 70i) sans toutefois produire de changements détectables dans les concentrations hépatiques d'Hsp60, d'Hsc70 et d'Hsp90. Ces résultats ont été obtenus par des immunobuvardage de type Western effectués sur les protéines totales du foie de souris traitées avec une dose unique de 200 mg/kg (i.p.) d'ACT sur une période allant jusqu'à 24h; durée pour

laquelle l'accumulation des Hsps 25 et 70i était maximale. Des analyses par immunofluorescence ont confirmé ces données tout en mettant en évidence la distribution de ces protéines dans le foie. À tous les temps de traitement, soit après 3h, 6h et 24h, une accumulation d'Hsp70i est remarquée dans les hépatocytes de la région centrolobulaire et des zones nécrosées. Un patron d'expression similaire est obtenu pour ce qui est d'Hsp25 après 3h et 6h. Néanmoins, après 24h de traitement, une différence importante est observable en ce qui concerne la distribution de ces deux Hsps. En effet, l'accumulation d'Hsp25 est minimale au niveau des hépatocytes de la région centrolobulaire et beaucoup plus forte dans les cellules en périphérie et environnant les zones de nécrose, contrairement à ce qui est remarqué pour Hsp70i. En superposant les résultats des études d'immunofluorescence ayant pour but de détecter les Hsps et de détecter l'ACT et ses métabolites, les auteurs ont constaté qu'une accumulation des métabolites de l'ACT coïncide avec l'augmentation de l'expression des Hsps 25 et 70i. De plus, un gonflement de ces mêmes cellules a été observé sur les tissus analysés.

Récemment, une autre équipe de recherche a utilisé l'ACT lors d'une autre étude d'hépatotoxicité (Sumioka *et al.*, 2004). Dans cette nouvelle étude, la dose d'ACT a été administrée par voie orale et était plus importante que dans l'étude présentée précédemment, soit de 500 mg/kg. De plus, la période d'observation du traitement a été augmentée à 48h, comparativement à 24h pour la première étude. Les résultats de cette nouvelle étude ont démontré que l'expression d'Hsp70i dans le foie commence à augmenter 1 heure après l'administration de la substance hépatotoxique. Le niveau d'expression de cette Hsp augmente de façon marquante jusqu'à 9h, puis se stabilise et reste sensiblement le même après 24h et 48h. Contrairement aux résultats obtenus pour Hsp70i, aucune augmentation significative d'Hsp25 dans les hépatocytes n'a été observée dans les 9 premières heures suivant l'administration de l'ACT. Le niveau d'expression d'Hsp25 était par contre très augmenté 24h et 48h après le traitement (Sumioka *et al.*, 2004).

Les résultats de ces deux études suggèrent un rôle des Hsps 25 et 70i dans la protection des hépatocytes contre la toxicité de l'ACT. Puisque l'expression d'Hsp70i est induite avant celle d'Hsp25, elle semble faire partie de la première ligne de défense des hépatocytes lors de lésions induites par l'ACT. Dans les premières heures suivant le traitement à l'ACT, Hsp70i en association avec Hsp25 pourrait servir de cible pour le NAPQI l'empêchant ainsi de détruire d'autres protéines en s'y associant. Ces Hsps auraient aussi pour fonction de réparer les protéines endommagées par le NAPQI dans les zones de nécrose (Sumioka *et al.*, 2004). Hsp25, qui semble exprimée plus tardivement qu'Hsp70i, pourrait quant à elle agir comme dispositif de protection en limitant la propagation de l'inflammation parmi les cellules atteintes; cela aurait pour effet de réduire le taux de nécrose des cellules et permettrait incidemment la survie des souris (Salminen *et al.*, 1996, 1997a; Sumioka *et al.*, 2004). Vraisemblablement, l'induction des Hsps 25 et 70i représenterait un important mécanisme de défense cellulaire au niveau du foie, procurant une cytoprotection contre certains agents hépatotoxiques (Agashe et Hartl, 2000; Morange, 2000; Slavotinek et Biesecker, 2001)

1.7 OBJECTIFS DE CE PROJET DE MAÎTRISE

Ainsi, ce projet de recherche se voulait une étude de l'effet hépatotoxique d'une administration chronique d'ACT à des souris pendant quatre semaines. Ce médicament a été utilisé afin de déterminer s'il existe une relation entre l'expression et la distribution des Hsp25 et 70 et l'expression et la distribution des K8/K18 dans les hépatocytes de souris soumises à cet agent hépatotoxique. Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article scientifique dans la section suivante.

CHAPITRE 2

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'acétaminophène (ACT) est, à fortes doses, un agent hépatotoxique. La toxicité de ce médicament est associée à l'expression de protéines de stress (Hsps), soit Hsp25 et 70i. Dans la présente étude, nous avons examiné la relation entre l'expression et la distribution dans le foie des Hsps (25 et 70i) et des kératines (K8/18), soit une classe de filaments intermédiaires, chez des souris soumises à un traitement chronique à l'acétaminophène. Des souris adultes ont été nourries avec une diète contrôle ou une diète contenant 1% p/p d'ACT pour une période de 4 mois. Les immunobuvardage de type Western ont montré que les niveaux d'Hsps (25 et 70i) sont augmentés après seulement 1 mois de traitement. Des sections de foie ont été traitées par immunofluorescence pour la détection des Hsps (25 et 70i) et de la K8. Après 1 à 3 mois de traitement, nous pouvons observer qu'Hsp70i et Hsp25 sont distribuées principalement dans les hépatocytes de la zone centrolobulaire. Une réorganisation des kératines est observée dans plusieurs de ces cellules. Après 4 mois de ce traitement, Hsps 25 et 70i sont localisées au niveau de la membrane plasmique et du noyau des hépatocytes étroitement associés aux veines centrales. La réorganisation du réseau de filaments intermédiaires affecte une large étendue de cellules. La modification du réseau de kératine dans les hépatocytes exprimant de hauts niveaux d'Hsps suggère un rôle pour ces kératines dans la protection des hépatocytes contre les agents toxiques.

2.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE

CHRONIC INTOXICATION OF MICE WITH ACETAMINOPHEN INDUCES HEAT SHOCK PROTEINS
EXPRESSION AND REORGANISATION OF KERATIN INTERMEDIATE FILAMENTS IN
CENTRIOBULAR HEPATOCYTES

Jolin Caroline, Fortier Anne-Marie, English Luc, Cadrin Monique

Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351
Boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Corresponding author's name :

Monique Cadrin

Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351
Boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Tel.: (819) 376-5011 poste 3891 Fax: (819) 376-5084

Email: Monique_Cadrin@uqtr.ca

ABSTRACT

Acetaminophen is, at high doses, a hepatotoxic agent. Acetaminophen toxicity is associated with expression of heat shock proteins, Hsps 25 and 70i. In the present study we examined the relationship between expression and liver distribution of Hsps (25 and 70i) and keratin (K8/K18) intermediate filaments in acetaminophen fed mice livers. Adult mice were fed a control diet or a diet containing acetaminophen (1,0% W/W) for up to 4 months. Western blotting showed that the levels of Hsps 70i and 25 were increased after 1 month of treatment. Liver sections were stained for the detection of Hsp70i, Hsp25 and keratin intermediate filaments, K8. After 1 to 3 months of treatment, Hsps 70i and 25 were diffusely distributed in centrilobular hepatocytes. Reorganisation of keratin intermediate filaments was observed in most of these hepatocytes. After 4 months of treatment, Hsps 25 and 70i were localised at the plasma membrane and in the nuclei of hepatocytes closely associated with central veins. The reorganisation of keratin intermediate filaments was observed in these hepatocytes and in some surrounding hepatocytes. The modification of keratin cytoskeleton in hepatocytes expressing high levels of Hsps suggests a role for keratin intermediate filaments in the protection of hepatocytes against toxic agents.

Keywords : liver, hepatocytes, intermediate filaments, acetaminophen, Hsps (heat shock proteins), Hsp25, Hsp70i, K8, K18, keratins.

INTRODUCTION

Intermediate filaments (IFs) constitute a complex family of proteins present in nearly all animal cells. They are classified into six groups based on sequence similarities (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 1998, 2000; Yoon *et al.*, 2001). Types I-IV and type VI are present in the cytoplasm as part of the cytoskeleton while type V corresponds to nuclear lamins (type A, B or C), which are ubiquitous to all cells (Fuchs and Weber, 1994; Fuchs and Cleveland, 1998; Herrmann and Aebi, 1998, 2000; Herrmann *et al.*, 2000).

Types I and II are, respectively, the acidic and neutral-basic keratins present in all epithelial cells (Moll *et al.*, 1982) and represent the largest and most complex group of IF proteins (Fuchs and Weber, 1994; Coulombe and Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003). They represent a large family of more than 50 proteins (Fuchs and Weber, 1994; Omary and Ku, 1997; Fuchs and Cleveland, 1998; Ku *et al.*, 1999; Coulombe and Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003). Type I and type II keratins are obligate heteropolymers express differentially in predictable pairs in different epithelial tissues at various stages of development and differentiation (Franke *et al.*, 1982; Fuchs *et al.*, 1987; Phillips J., 1988; Steinert and Roop, 1988). All epithelial cells express at least one type I and one type II keratin (Omary *et al.*, 2002). One well established keratin function in the skin, cornea, and liver is to maintain cellular integrity upon mechanical and toxic stresses (Fuchs and Coulombe, 1992; Omary and Ku, 1997; Fuchs and Cleveland, 1998; Toivola *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001; Coulombe and Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003).

The IF network of hepatocytes is composed of one keratin of type I, K18, and one of type II, K8 (Omary and Ku, 1997; Magin *et al.*, 1998; Toivola *et al.*, 1998; Ku *et al.*, 1999; Toivola *et al.*, 2000). In hepatocytes, IFs form a complex cytoplasmic network

that is denser at the cell plasma membrane specially around the bile canaliculi (Cadrin and Martinoli, 1995; Chou and Goldman, 2000; Omary *et al.*, 2002). Hepatocytes K8/K18 filament network is believed to play a cytoprotective role, since in their absence or disruption in mice, hepatocytes become markedly fragile and susceptible to stress or toxin induced liver injury. For instance, hepatocytes from mice carrying these modifications become more susceptible to exposure to griseofulvin, acetaminophen, pentobarbital, microcystin or partial hepatectomy (Ku *et al.*, 1995; Ku *et al.*, 1996; Omary and Ku, 1997; Toivola *et al.*, 1998; Toivola *et al.*, 2000). In human, K8 and K18 mutations predispose to the development of liver disease and likely account for some cases of cryptogenic liver disease (Ku *et al.*, 1997; Ku *et al.*, 2001; Omary *et al.*, 2002).

Acetaminophen (ACT), is an analgesic and antipyretic agent widely used for the treatment of mild to moderate pain and fever when an anti-inflammatory effect is not necessary (Davidson and Eastham, 1966; Prescott *et al.*, 1971). At high doses ACT is known to be a severe hepatotoxic agent. ACT is largely metabolized (95%) by conjugation with glucuronic acid and sulfate, converted to acetaminophen sulfate and acetaminophen glucuronide and excreted. The remaining 5% is metabolized by Cytochrome p-450-dependent glutathione (GSH) conjugation and leads to the formation of a highly active metabolite, N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) that reacts with GSH. When GSH is exhausted, NAPQI binds to cellular proteins which lead to cellular death (Black, 1984; Maruyama and Williams, 1988; Reicks *et al.*, 1988; Krahenbuhl, 1999).

In mouse hepatocytes, ACT toxicity is associated with increased expression of the stress inducible heat shock proteins (Hsp), Hsp25 and Hsp70i, in hepatocytes containing the active ACT metabolite NAPQI (Salminen *et al.*, 1997a, 1997b, 1998b; Sumioka *et al.*, 2004). Hsps are ubiquitous proteins, highly conserved throughout evolution and are present in all type of cells (Lindquist and Craig, 1988; Schlesinger, 1990; Parsell and

Lindquist, 1993; Liang and MacRae, 1997; Morimoto *et al.*, 1997). They can be divided into 6 main families, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 and the small Hsps, according to their molecular weights, structure and function (Lindquist and Craig, 1988; Parsell and Lindquist, 1993; Whitley *et al.*, 1999). Several families include members that are constitutively expressed as well as members whose synthesis is induced by heat stress and by a variety of other adverse stimuli (Salminen *et al.*, 1997). For example, Hsp90, Hsc70 and Hsp60 are expressed constitutively at appreciable levels in cells while levels of Hsp70i are relatively low and Hsp25 is virtually undetectable (Feder and Hofmann, 1999). However, not all Hsps are stress-inducible (Pelham, 1986; Ellis, 1987).

Hsps function as molecular chaperones (Parsell and Lindquist, 1993; Frydman and Hohfeld, 1997; Liang and MacRae, 1997; Feder and Hofmann, 1999; Jaattela, 1999; Kaufman, 1999; Whitley *et al.*, 1999). A molecular chaperone is a protein that binds to and stabilizes an otherwise unstable conformer of a protein and, by controlled binding and release of the substrate protein, facilitates its correct fate *in vivo*: folding, oligomeric assembling, transporting to a particular subcellular compartment, controlling switching between active/inactive conformations, incorrect aggregation of exposed hydrophobic regions or facilitating the degradation of irreversibly damaged proteins (Ellis and Hartl, 1999). The expression of the stress inducible forms of Hsps is enhanced by the presence of non-native proteins caused by a variety of environmental or metabolic stresses that include the following: heat shock, ischemia, anoxia, heavy metal ion, ethanol, surgical stress, viral/bacterial agents, UV light, toxic chemical, cocaine, pharmacologically active molecules, aging, cancer etc. (Lowry *et al.*, 1951; Sandermann and Strominger, 1972).

Since keratins IFs have been proposed to play a role in protection of hepatocytes against toxic stress, the aim of the present study was to determine if a relationship exists

between the expression and liver distribution of the stress proteins Hsp70 and Hsp25 induced by the presence of NAPQI following ACT intoxication and K8/K18 intermediate filaments expression and organisation in acetaminophen intoxicated mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatments

Adult male C3H mice (Charles River Canada, St-Constant, QC) were fed *ad libitum* a semi-synthetic complete diet (Teklad test diet, Madison, WI) containing 1% (w/w) ACT for periods ranging from 1 month to 4 months. Control mice were fed the same diet without ACT. Mice were separated in 5 groups; 6 mice were in control group and 20 other mice were distributed equally in four group, for each treatment time. Mice were sacrificed by cervical dislocation and livers were kept frozen at -80°C in 2-methylbutane until used. All experimentations was performed 3 times.

Gel electrophoresis and Western blotting

Total liver proteins were prepared by homogenisation of 400 mg of control and treated mice liver in sample buffer (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8 containing SDS 0.5%, PMSF 0.4 mM, DTT 0.1 mM). Protein concentration was determined by a modified Lowry's method for the presence of SDS (Lowry *et al.*, 1951) and equal amounts of proteins were loaded on each well (5µg). Protein from each sample were separated on a 12.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) according to Laemmli's procedure (Laemmli, 1970). Gels were stained with 0.1% Coomassie Blue to ensure that equal amounts of proteins were loaded, or transferred to supported nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories Canada, Mississauga, ON) (Towbin *et al.*, 1979) stained with Ponceau S red to monitor the transfer, washed in TTBS (TBS with 0.5% TWEEN 20®) and probed for 1 hour at 37°C with a rat IgG

monoclonal anti-mouse K8, TROMA I (Kemler *et al.*, 1981; Boller *et al.*, 1987) and a rabbit polyclonal anti-Hsp70i (Stressgen, Victoria, BC) or Hsp25 (Stressgen, Victoria, BC). The membranes were then washed and incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate secondary antibody; a biotinylated goat anti-rabbit or a biotin conjugated goat anti-rat (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). When biotinylated secondary antibodies were used, membranes were washed with PBS-Tween 20 and incubated with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) for 30 min and washed with PBS-Tween 20. The chemiluminescent horseradish peroxidase substrate Luminol (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON) was added to the membranes according to recommendations of the company, and membranes were exposed to Blue X-Omat X-ray film sheets (Mandel Scientific Company, Guelph, ON) to localize antibodies binding.

Fluorescence microscopy

Double labelling for the detection of Hsps 25, 70i, and keratins, K8, was performed as follows. Cryosections, 4 μ m of fresh livers were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) for 10 minutes at room temperature and rinsed in TBS (Tris-buffer saline, pH 7.4). For heat shock proteins staining, liver sections were incubated in TBS containing SDS 1%, to retrieve antigen sites, rinsed in TBS, incubated with a rabbit polyclonal anti-Hsp70i or anti-Hsp25 (1 : 100) (Stressgen, Victoria, BC) for 1 hour at 37°C, rinsed in TBS and incubated for 1 hour at room temperature with the secondary antibody donkey anti-rabbit conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (1 : 50) (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). For the detection of K8, sections were incubated with a rat IgG monoclonal anti-mouse K8, TROMA I (Kemler *et al.*, 1981; Boller *et al.*, 1987), for 45 minutes at room temperature, rinsed in PBS (sodium phosphate buffer, pH 7.2) and incubated with secondary antibody, a goat anti-rat IgG conjugated to tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) (1 : 50) for 30 minutes at room temperature (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific,

Mississauga, ON). The tissues were mounted in 0.1% P-phenylene-diamine in 50% glycerol/PBS and observed under an Olympus® BX60 photomicroscope.

RESULTS

Expression of Hsp25, Hsp70i, and K8 in ACT treated mice livers

Modifications in the amount of Hsp70i, Hsp25 and K8 were analyzed by Western Blotting of total proteins from control and ACT-treated C3H mice livers (1 to 4 months) (Fig 1). Our results showed that ACT intoxication induces modifications in Hsp70i, Hsp25 and keratin expression. Hsp70i, which is present in control livers, was increased at all time points treatment (Fig. 1A). The maximum increase for Hsp70i was observed at 1 month treatment but its expression was higher than control value for the whole treatment. Contrary to Hsp70i, Hsp25 was not observed in control liver but was present after ACT treatment (Fig 1A). As for Hsp70i the maximum increase was observed at 1 month treatment but was detected during the whole treatment. An important increase in K8 level also took place during ACT treatment (Fig. 1B). The amount of K8 was increased after 1 month of treatment and remained higher than control value for the entire treatment. Fig. 1C shows a representative gel of total liver proteins separated on 12,5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue indicating that the same amount of proteins was loaded on in each well of the gel.

Localization of Hsp25, Hsp70i and K8/18 during ACT intoxication

We analyzed by performing double immunofluorescence staining, the distribution of Hsp70i, Hsp25 and keratin IFs on liver sections of control and ACT-treated C3H mice livers. In control hepatocytes, IFs formed a complex cytoplasmic network that was denser at the cell membrane and particularly around the bile canaliculi (Fig. 2A). Our biochemical analysis showed that Hsp70i was present in control hepatocytes. However,

by immunofluorescence we did not detect the presence of Hsp70i in the cells (Fig. 2B). After ACT treatment an increase in keratin IFs was observed in hepatocytes located in the proximity of the central vein in comparison with other hepatocytes. Interestingly after 1 and 2 months of ACT treatment, Hsp70i (Fig 2 D, F) was present in hepatocytes that show increased amount of keratin IFs. At 3 months and 4 months of treatment, the zone containing dense cytoplasmic keratin IF network occupied a larger area than the zone that contained Hsp70i. Hsp70i was present in hepatocytes in close proximity of the central vein of hepatic lobules. At the cellular level, Hsp70i was distributed evenly in the cytoplasm of hepatocytes from livers treated for 1 to 3 months. After 4 months of treatment, the protein relocated at the plasma membrane and a punctate cytoplasmic and nuclear staining was observed. In some hepatocytes there was colocalization between Hsp70i and keratin IFs.

In agreement with our biochemical analysis, Hsp25 was not present in control hepatocytes (Fig 3B). After ACT treatment Hsp25 was increased in hepatocytes located in proximity of central veins. As observed for Hsp70i, at one and two months treatments, Hsp25 was present in hepatocytes that contained a dense keratin IF network. Following longer treatment, Hsp25 was present in fewer hepatocytes in close proximity with the central vein. At the cellular level, Hsp25 was localized at the plasma membrane with a punctuate pattern in the cytoplasm of hepatocytes. It is important to note that the cytoplasmic staining of Hsp25 colocalized with keratin IF network.

DISCUSSION

Acute intoxication with ACT is known to cause severe hepatotoxicity that leads to liver failure. The aim of the present study was to determine the effect of chronic ACT intoxication on the liver. We investigated Hsps expression and distribution in hepatocytes and attended to determine if there was a link between Hsps and keratin

expression in hepatocytes exposed to the toxicant. This study presents from our knowledge the first evidence that chronic intoxication with ACT induces an increased expression in keratins and a modification in their organisation. The stress proteins Hsp25 and 70i were increased during ACT treatment. We noticed that Hsp70i was present in a constitutive manner in hepatocytes since it is present in control hepatocytes. Hsp25 was not detected in control hepatocytes. Our results showed that ACT induced an increase in K8 expression in hepatocytes during the first month of treatment and that the increase was maintained for the entire treatment. The stress proteins Hsp25 and 70i were also increased during ACT treatment. Our results are consistent with the findings of Salminen *et al.*; who showed that the level of Hsp70i is relatively low, and Hsp25 is virtually undetectable in the liver of naive mice (Salminen *et al.*, 1997). After a rapid increase in Hsps expression following the beginning of the treatment, there was a constant reduction in the quantity of Hsps from the 2nd month until the end of the treatment (4 months). However, the quantity remains higher than the control value. Consistent with the Western blot analyses, immunofluorescence staining showed an increase in Hsp25 and Hsp70i levels at 1, 2 and 3 months treatment. After 4 months of treatment, there was a reduction of the quantity of Hsps and its location was different. However, the amount remains higher than control value. The Hsps were detected in hepatocytes located in close vicinity of the central vein.

Chronic intoxication of mice with ACT induces modifications in keratin expression and organisation in hepatocytes located in centrilobular zones. In fact, we noticed that during the first three months of the intoxication, there seems to be an accumulation of IFs in the hepatocytes located around the centrilobular veins in comparison with hepatocytes located in the middle or in proximity of the portal area. In liver from control animals, IFs are distributed uniformly in all hepatocytes. We also notice the centrilobular distribution of Hsp25 and Hsp70i during the first 3 months of the treatment. Salminen *et al.* also noticed this distribution of the Hsps in the hepatocytes during ACT treatments (Salminen *et al.*, 1997a, 1997b, 1998b). In the 4 months

treatments, we can also find this centrilobular distribution. However, we also find Hsps in the nucleus of cells, which are elsewhere than in the centrilobular zone.

Some hepatotoxic agent, like griseofulvine (GF), alcohol, or okadaic acid, induce the formation of IF aggregates in hepatocytes called Mallory Bodies (MBs) (Denk *et al.*, 1975; Omary and Ku, 1997; Ku *et al.*, 1999; Cadrin *et al.*, 2000). Many studies demonstrated that the MBs contain K8 and K18 as main constituents (Jensen and Gluud, 1994a; Cadrin and Martinoli, 1995). Formation of MBs would be a consequence of the increase of the synthesis and the saturation of the mechanism of degradation of keratins through the ubiquitin pathway, which would lead to the accumulation of K8 and K18 in hepatocytes (Hutter *et al.*, 1993; Kachi *et al.*, 1993; Cadrin *et al.*, 1995). Chronical intoxication of mouse with a diet containing GF leads to the formation of MBs which are biochemically and morphologically identical to those developed in human liver pathologies like alcoholic hepatitis, North American Indian childhood cirrhosis or Wilson's disease (Franke *et al.*, 1979; French S.W., 1987; Jensen and Gluud, 1994a; Cadrin *et al.*, 1995).

Overdose of ACT is known to cause severe hepatotoxicity that leads to liver failure. A number of observations suggest that stress induction of Hsps expression is mediated by the presence of non-native proteins (Salminen *et al.*, 1997a; Salminen *et al.*, 1998a). It has been proposed that Hsps bind non-native proteins and help them to either refold or enhance their degradation, thereby helping cell survival (Parsell and Lindquist 1994). Hsp70i, after treatment with ACT, has been shown to be present in hepatocytes, confined to the centrilobular region and containing the toxic metabolite of the drug (Salminen *et al.*, 1997a). Therefore Hsps most likely play a cytoprotective role in these hepatocytes (Huot *et al.*, 1991; Jaattela and Wissing, 1992; Salminen *et al.*, 1997a). Our results shown that many hepatocytes containing increased Hsp70i and Hsp25 contain a denser IF network. Moreover, there is a colocalization between the IF network and the

Hsps in these hepatocytes. These results are in agreement with the findings of Perng *et al.* showing colocalization between Hsp27 or α B-crystallin, both member of the small heat shock proteins family (sHsps), and GFAP (glial fibrillar acid protein) or vimentine IFs in astrocytoma cells (Perng *et al.*, 1999; Quinlan and Van Den Ijssel, 1999). These results suggest that Hsps could protect IF keratins during chronic stress and help the cell maintaining its integrity. The association between sHsps chaperones and IFs could protect their structural integrity and prevent their aggregation in the form of MBs during ACT treatment (Salminen *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 1997a, 1997b). Our work does not totally exclude the possibility that longer treatment could lead to the appearance of MBs.

In conclusion, ACT intoxication of mice lead to increased levels of Hsp25 and Hsp70i in the hepatocytes. The increase in IFs in these hepatocytes supports a role for keratin in the protection of hepatocytes against hepatotoxins. The colocalization Hsps and IFs suggest that maintenance of an intact IF network is necessary to play there protective role.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are most grateful to Dr N. Marceau from the Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec, for providing TROMA I. This work was supported by a grant from NSERC to MC.

RÉFÉRENCES

- Black, M. 1984. Acetaminophen hepatotoxicity. Annu Rev Med, 35: 577-93
- Boller, K., Kemler, R., Baribault, H. and Doetschman, T. 1987. Differential distribution of cytokeratins after microinjection of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. Eur J Cell Biol, 43: 459-68
- Cadrin, M., Anderson, N. M., Aasheim, L. H., Kawahara, H., Franks, D. J. and French, S. W. 1995. Modifications in cytokeratin and actin in cultured liver cells derived from griseofulvin-fed mice. Lab Invest, 72: 453-60
- Cadrin, M., Hovington, H., Marceau, N. and McFarlane-Anderson, N. 2000. Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver. J Hepatol, 33: 199-207
- Cadrin, M. and Martinoli, M. G. 1995. Alterations of intermediate filaments in various histopathological conditions. Biochem Cell Biol, 73: 627-34
- Chou, Y. H. and Goldman, R. D. 2000. Intermediate filaments on the move. J Cell Biol, 150: F101-6
- Coulombe, P. A. and Omary, M. B. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Curr Opin Cell Biol, 14: 110-22
- Davidson, D. G. and Eastham, W. N. 1966. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. Br Med J, 5512: 497-9
- Denk, H., Gschnait, F. and Wolff, K. 1975. Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. Lab Invest, 32: 773-6
- Ellis, J. 1987. Proteins as molecular chaperones. Nature, 328: 378-9

Ellis, R. J. and Hartl, F. U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. Curr Opin Struct Biol, 9: 102-10

Feder, M. E. and Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol, 61: 243-82

Franke, W. W., Denk, H., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K. 1979. Ultrastructural, biochemical, and immunologic characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice. Fimbriated rods of filaments containing prekeratin-like polypeptides. Lab Invest, 40: 207-20

Franke, W. W., Schmid, E., Schiller, D. L., Winter, S., Jarasch, E. D., Moll, R., Denk, H., Jackson, B. W. and Illmensee, K. 1982. Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 46 Pt 1: 431-53

French S.W., O. T., Swierenga S.H.H., Marceau N., 1987, The cytoskeleton of hepatocytes in health and disease, *in* Edited by Faber E, ed., Pathogenesis of liver disease: Baltimore, Williams & Wilkins., Phillips MJ., p. 95-112.

Frydman, J. and Hohfeld, J. 1997. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. Trends Biochem Sci, 22: 87-92

Fuchs, E. and Cleveland, D. W. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science, 279: 514-9

Fuchs, E. and Coulombe, P. A. 1992. Of mice and men: genetic skin diseases of keratin. Cell, 69: 899-902

Fuchs, E., Tyner, A. L., Giudice, G. J., Marchuk, D., RayChaudhury, A. and Rosenberg, M. 1987. The human keratin genes and their differential expression. Curr Top Dev Biol, 22: 5-34

Fuchs, E. and Weber, K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. Annu Rev Biochem, 63: 345-82

Herrmann, H. and Aebi, U. 1998. Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. Subcell Biochem, 31: 319-62

Herrmann, H. and Aebi, U. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. Curr Opin Cell Biol, 12: 79-90

Herrmann, H., Strelkov, S. V., Feja, B., Rogers, K. R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D. A., Steinert, P. M., Burkhard, P. and Aebi, U. 2000. The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. J Mol Biol, 298: 817-32

Huot, J., Roy, G., Lambert, H., Chretien, P. and Landry, J. 1991. Increased survival after treatments with anticancer agents of Chinese hamster cells expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. Cancer Res, 51: 5245-52

Hutter, H., Zatloukal, K., Winter, G., Stumptner, C. and Denk, H. 1993. Disturbance of keratin homeostasis in griseofulvin-intoxicated mouse liver. Lab Invest, 69: 576-82

Jaattela, M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. Ann Med, 31: 261-71

Jaattela, M. and Wissing, D. 1992. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. Ann Med, 24: 249-58

Jensen, K. and Gluud, C. 1994a. The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). Hepatology, 20: 1061-77

Kachi, K., Cadrin, M. and French, S. W. 1993. Synthesis of Mallory body, intermediate filament, and microfilament proteins in liver cell primary cultures. An electron microscopic autoradiography assay. Lab Invest, 68: 71-81

Kaufman, R. J. 1999. Molecular chaperones and the heat shock response. Sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, 6-10 May 1998. Biochim Biophys Acta, 1423: R13-27

Kemler, R., Brulet, P., Schnebelen, M. T., Gaillard, J. and Jacob, F. 1981. Reactivity of monoclonal antibodies against intermediate filament proteins during embryonic development. J Embryol Exp Morphol, 64: 45-60

Kirfel, J., Magin, T. M. and Reichelt, J. 2003. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. Cell Mol Life Sci, 60: 56-71

Krahenbuhl, S. 1999. Acarbose and acetaminophen--a dangerous combination? Hepatology, 29: 285-7

Ku, N. O., Gish, R., Wright, T. L. and Omary, M. B. 2001. Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. N Engl J Med, 344: 1580-7

Ku, N. O., Michie, S., Oshima, R. G. and Omary, M. B. 1995. Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. J Cell Biol, 131: 1303-14

Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L., Oshima, R. G. and Omary, M. B. 1996. Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant. J Clin Invest, 98: 1034-46

Ku, N. O., Wright, T. L., Terrault, N. A., Gish, R. and Omary, M. B. 1997. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. J Clin Invest, 99: 19-23

Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M. and Omary, M. B. 1999. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. Am J Physiol, 277: G1108-37

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-5

Liang, P. and MacRae, T. H. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. J Cell Sci, 110 (Pt 13): 1431-40

Lindquist, S. and Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet, 22: 631-77

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265-75

Magin, T. M., Schroder, R., Leitgeb, S., Wanninger, F., Zatloukal, K., Grund, C. and Melton, D. W. 1998. Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin

filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. J Cell Biol, 140: 1441-51

Maruyama, H. and Williams, G. M. 1988. Hepatotoxicity of chronic high dose administration of acetaminophen to mice. A critical review and implications for hazard assessment. Arch Toxicol, 62: 465-9

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell, 31: 11-24

Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N. and Cotto, J. J. 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. Essays Biochem, 32: 17-29

Omary, M. B. and Ku, N. O. 1997. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. Hepatology, 25: 1043-8

Omary, M. B., Ku, N. O. and Toivola, D. M. 2002. Keratins: guardians of the liver. Hepatology, 35: 251-7

Parsell, D. A. and Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet, 27: 437-96

Pelham, H. R. 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell, 46: 959-61

Perng, M. D., Cairns, L., van den, I. P., Prescott, A., Hutcheson, A. M. and Quinlan, R. A. 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. J Cell Sci, 112 (Pt 13): 2099-112

Phillips J., S. P., 1988, The cytoskeleton of the hepatocyte: organisation, relationships, and pathology., in J. W. Edited by Arias IM, Popper H, Schachter D, Shafritz DA., ed., The liver: Biology and pathobiology: New York, Raven press, Ltd., p. 11-27.

Prescott, L. F., Roscoe, P., Wright, N. and Brown, S. S. 1971. Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. Lancet, 1: 519-22

Quinlan, R. and Van Den Ijssel, P. 1999. Fatal attraction: when chaperone turns harlot. Nat Med, 5: 25-6

Reicks, M., Calvert, R. J. and Hathcock, J. N. 1988. Effects of prolonged acetaminophen ingestion and dietary methionine on mouse liver glutathione. Drug Nutr Interact, 5: 351-63

Salminen, W. F., Jr., Roberts, S. M., Fenna, M. and Voellmy, R. 1997. Heat shock protein induction in murine liver after acute treatment with cocaine. Hepatology, 25: 1147-53

Salminen, W. F., Jr., Roberts, S. M., Pumford, N. R. and Hinson, J. A. 1998a. Immunochemical comparison of 3'-hydroxyacetanilide and acetaminophen binding in mouse liver. Drug Metab Dispos, 26: 267-71

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R. and Roberts, S. M. 1997a. Differential heat shock protein induction by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. J Pharmacol Exp Ther, 282: 1533-40

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R. and Roberts, S. M. 1997b. Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: the potential role of heat shock protein induction. Toxicol Appl Pharmacol, 147: 247-58

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R. and Roberts, S. M. 1998b. Effect of N-acetylcysteine on heat shock protein induction by acetaminophen in mouse liver. J Pharmacol Exp Ther, 286: 519-24

Sandermann, H., Jr. and Strominger, J. L. 1972. Purification and properties of C 55 - isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 247: 5123-31

Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. J Biol Chem, 265: 12111-4

Steinert, P. M. and Roop, D. R. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annu Rev Biochem, 57: 593-625

Sumioka, I., Matsura, T., Kai, M. and Yamada, K. 2004. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. Life Sci, 74: 2551-61

Toivola, D. M., Baribault, H., Magin, T., Michie, S. A. and Omary, M. B. 2000. Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 279: G1343-54

Toivola, D. M., Omary, M. B., Ku, N. O., Peltola, O., Baribault, H. and Eriksson, J. E. 1998. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity. Hepatology, 28: 116-28

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, 76: 4350-4

Whitley, D., Goldberg, S. P. and Jordan, W. D. 1999. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. J Vasc Surg, 29: 748-51

Yoon, K. H., Yoon, M., Moir, R. D., Khuon, S., Flitney, F. W. and Goldman, R. D. 2001. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. J Cell Biol, 153: 503-16

FIGURES LEGENDS

FIGURE 1 – Biochemical analysis. A) Western blotting of total proteins with anti-Hsps70i and anti-Hsp25 showed that the level of both proteins is increased during the treatment. There is an increase in Hsps70i expression after 1 month of treatment. After 4 months of treatment, the Hsps70i level decreased but is still higher than the control value. After 1 month of treatment, Hsp25 level increased and slowly decreased after longer treatment periods. B) Western blotting of total proteins with TROMA I. The amount of K8 is increased after ACT treatment. C) Total liver proteins separated on 12,5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

FIGURE 2 – Effect of ACT on IF network and Hsp70i expression in hepatocytes from C3H mice. A, C, E, G, I Detection of keratin IF network. B, D, F, H, J Detection of Hsp70i. A, B Control livers; C, D 1 month treatment; E, F 2 months treatment; G, H 3 months treatment; I, J 4 month treatment. After 1 to 3 months treatment, the keratin IF network was reorganised in a large number of hepatocytes located in centrilobular zones. Hsp70i was present in hepatocytes located in centrilobular zones after 1 to 3 month of treatment. After 4 months of treatment, Hsp70i was localised in the plasma membrane and in the nuclei of hepatocytes closely associated with central veins.

FIGURE 3 – Effect of ACT on IF network and Hsp25 expression in hepatocytes from C3H mice. A, C, E, G, I Detection of keratin IF network. B, D, F, H, J Detection of Hsp25. A, B Control livers; C, D 1 month treatment; E, F 2 months treatment; G, H 3 months treatment; I, J 4 months treatment. The keratin IF network was reorganised in a large number of hepatocytes located around the centrilobular zones. Between 1 to 3 months treatment, Hsp25 was present in hepatocytes located in centrilobular zones. After 4 months of treatment, Hsp25 was localised in the plasma membrane and in the nuclei of hepatocytes closely associated with central veins.

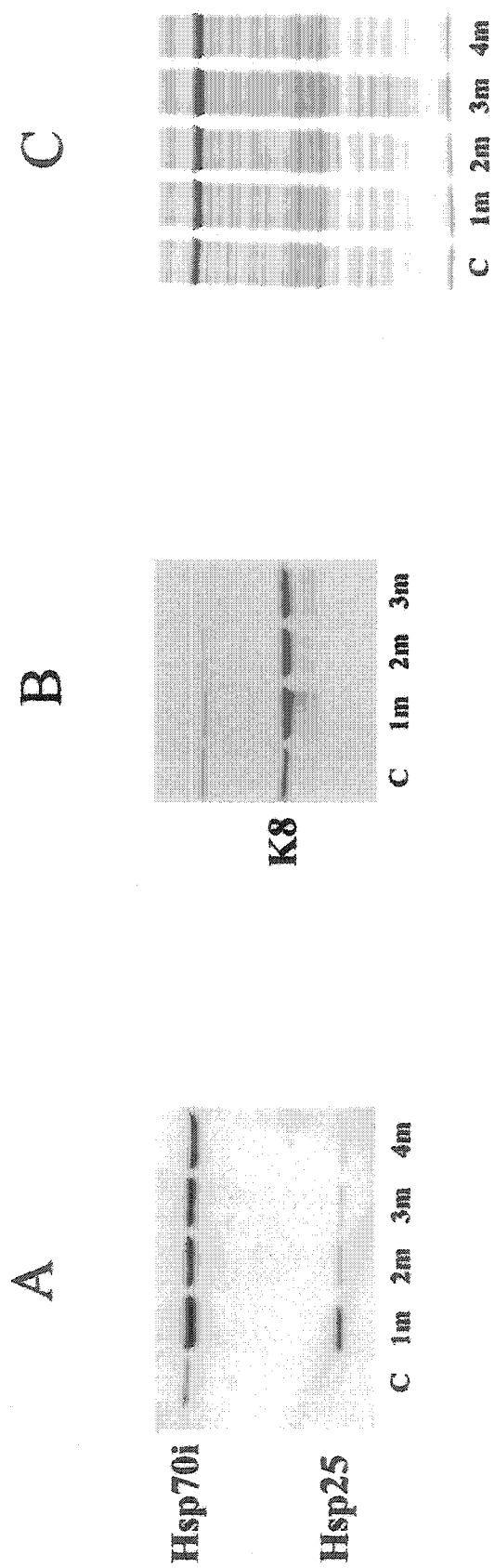


Figure 1

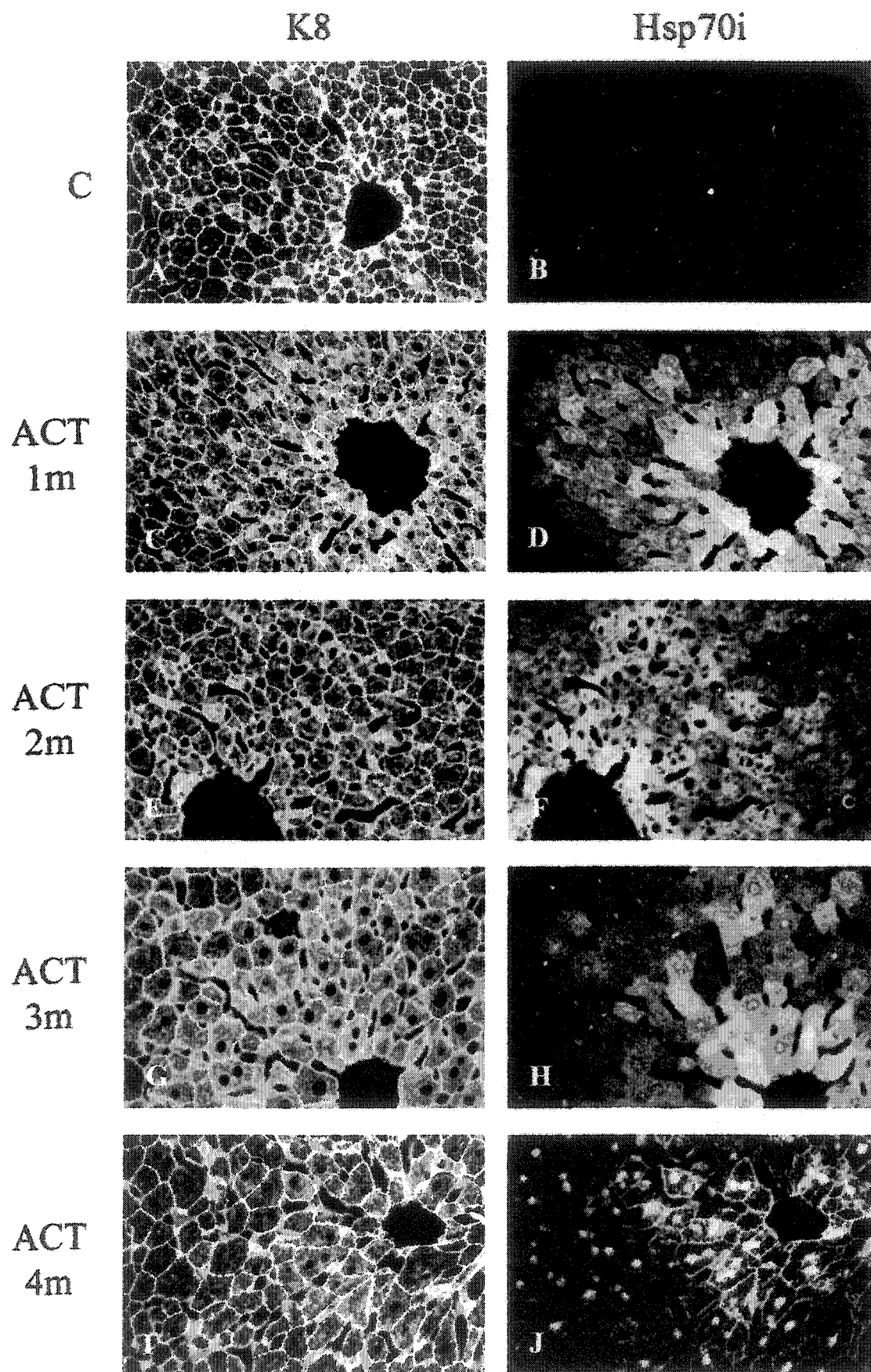


Figure 2

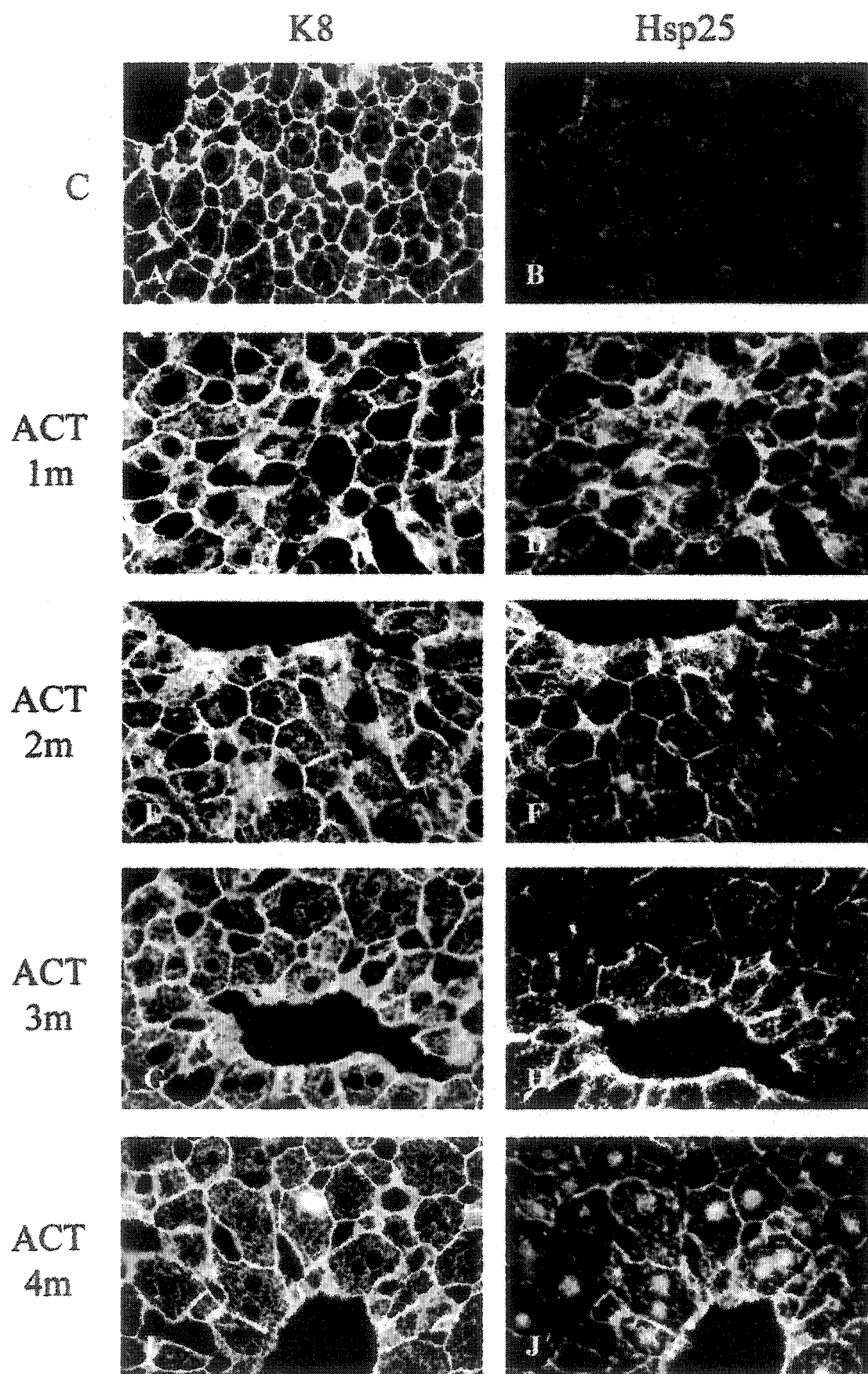


Figure 3

CHAPITRE 3

CONCLUSION

3.1 DISCUSSION

Le but de ce projet de maîtrise était de permettre l'étude de l'effet d'une intoxication à long terme à l'ACT sur le niveau d'expression et la distribution des protéines de FIs (K8 et K18) et des Hsps (Hsp25 et 70i) dans les hépatocytes de souris. Des souris C3H ont ainsi été soumises à un traitement chronique à l'ACT pour une durée allant de 1 à 4 mois. Suite à ce traitement, des analyses d'immunobuvardage de type Western et des expériences d'immunohistochimie ont été effectuées sur les hépatocytes de souris contrôles ainsi que sur les hépatocytes de souris traitées à l'ACT pour différentes périodes de temps.

3.1.1 Détection de K8, Hsp25 et Hsp70i par immunobuvardage de type Western

Nos travaux ont permis de montrer pour la première fois qu'un traitement chronique avec l'ACT entraîne une augmentation de l'expression des kératines dans les hépatocytes dès le premier mois de traitement. Cette augmentation est maintenue tout au long du traitement. Nos résultats montrent aussi que les niveaux d'expression d'Hsp25 et d'Hsp70i sont augmentés au cours de ce même traitement. Une importante augmentation de l'expression d'Hsp25 et, d'une façon encore plus marquée, d'Hsp70i, est visible dès le premier mois, ce qui est en accord avec des études antérieures réalisées par Salminen *et al.* (Salminen *et al.*, 1997a). À partir du deuxième mois et jusqu'à la fin du traitement, une diminution de l'expression de ces protéines est toutefois observable, par rapport au premier mois, en demeurant néanmoins plus élevée que dans les hépatocytes des souris contrôles. Il est aussi à noter que la diminution d'Hsp70i

observée est beaucoup moins importante que celle d'Hsp25. Cette hausse dans l'expression de ces deux types de protéines dans les hépatocytes lors du traitement est sans aucun doute attribuable à l'accumulation de métabolites toxiques de l'ACT dans les cellules (Salminen *et al.*, 1997a, 1997b, 1998). L'augmentation de l'expression des protéines de FIs, comme celle des Hsps, pourrait faire partie des mécanismes de protection contre les effets toxiques du NAPQI, un métabolite de l'ACT, en protégeant les protéines et les structures importantes au maintien de l'intégrité des hépatocytes tout en évitant la destruction de ces derniers. Des études antérieures utilisant des souris déficientes en K8 et des souris transgéniques portant une mutation sur la K18 (Arg89 → Cys) ont montré que les hépatocytes de ces souris étaient plus sensibles aux stress toxiques induits par la GF et l'ACT. Notre étude est donc en accord avec les études précédentes montrant que les kératines K8/K18 jouent un rôle de protection dans les cellules exposées à des agents hépatotoxiques (Ku *et al.*, 1995; Ku *et al.*, 1996; Loranger *et al.*, 1997; Cadrin *et al.*, 2000; Fausther *et al.*, 2004).

3.1.2 Localisation de K8, d'Hsp25 et d'Hsp70i par immunohistochimie

Les résultats obtenus lors des expériences d'immunohistochimie confirment les analyses biochimiques réalisées par immunobuvardage de type Western exposées précédemment. En effet, l'immunofluorescence permet de voir que l'expression d'Hsp25 et d'Hsp70i est augmentée dans les hépatocytes suite au traitement à l'ACT. Tout comme les résultats obtenus avec les immunobuvardages de type Western, la quantité d'Hsps détectée au 4^{ème} mois semble légèrement inférieure à celle des premiers mois de traitement mais tout de même plus élevée que dans les hépatocytes contrôles. De plus, après cette période de traitement, la localisation des Hsps dans les hépatocytes de souris ne correspond plus tout à fait à celle des trois premiers mois.

L'augmentation de la quantité d'Hsps dans les hépatocytes localisés au niveau de la veine centrolobulaire est causée par une arrivée massive de l'ACT au foie par les vaisseaux sanguins. L'ACT sera métabolisé causant ainsi une accumulation de métabolites toxiques dans les hépatocytes de cette zone (Salminen *et al.*, 1997a). Comme les cellules du foie ont pour rôle de filtrer et de détoxifier le sang, les premières cellules à être affectées par les substances toxiques sont celles situées autour des vaisseaux sanguins dont les veines centrolobulaires. Ainsi, on peut observer une augmentation des Hsps et de la K8/K18 dans ces zones dans les trois premiers mois du traitement. Cette arrivée massive de substances toxiques au niveau du foie pourrait aussi être la cause du gonflement des hépatocytes observé sur les coupes en immunofluorescence. En effet, lors de la comparaison des foies de souris contrôles et des foies de souris traitées à l'ACT, on peut remarquer que la taille des cellules est augmentée dans ceux des souris traitées. Au quatrième mois de traitement, le niveau d'expression de la K8/K18 semble continuer à augmenter alors que celui des Hsps diminue. L'hypothèse que nous proposons soutient que vers la fin du traitement les cellules pourraient être capables de faire face au stress suite à l'augmentation de l'expression des K8/K18. Ces dernières pourraient agir comme des molécules protectrices pour les hépatocytes en cas de choc toxique. Cette interprétation est en accord avec les résultats d'autres chercheurs (Ku *et al.*, 1996). En effet, l'équipe de Ku a montré que des souris transgéniques mutantes pour la K18 étaient plus susceptibles lors d'une administration d'ACT (400 mg/kg) ou lors de l'ingestion chronique de GF (1,25% p/p). Cette prédisposition à l'hépatotoxicité découlait directement de la mutation de la K18 car les souris normales étaient plus résistantes à l'agression (Ku *et al.*, 1996). Ceci vient donc appuyer nos conclusions.

Chez les souris contrôles, les niveaux d'Hsp70i et d'Hsp25 sont très peu élevés dans les hépatocytes; les Hsps sont même pratiquement indétectables (Salminen *et al.*, 1997). Les hépatocytes montrent une forme polygonale typique et les FIs sont distribués uniformément dans toutes les cellules (Cadrin et Martinoli, 1995). Nos résultats montrent toutefois que lors de l'intoxication chronique des souris par l'ACT, des

modifications importantes se produisent dans l'organisation des kératines ainsi que dans la distribution des Hsps dans les hépatocytes. Effectivement, lors des trois premiers mois d'intoxication, la présence presque exclusive des Hsp25 et Hsp70i est remarquée dans les hépatocytes localisés au niveau des zones centrolobulaires. Cette distribution des Hsps dans les hépatocytes de la zone centrolobulaire a aussi été observée par Salminen *et al.* lors de traitements à l'ACT (200 mg/kg i.p., 3-24 heures) (Salminen *et al.*, 1997a). Dans le cas d'Hsp70i, les protéines sont distribuées dans tout le cytoplasme des cellules, alors que dans celui d'Hsp25, les protéines sont plutôt localisées à la périphérie des hépatocytes, près de la membrane plasmique, là où se produit l'accumulation des métabolites toxiques de l'ACT (Salminen *et al.*, 1997a). Nos travaux montrent que durant les trois premiers mois de traitement, le réseau de FIs est réorganisé dans un grand nombre d'hépatocytes localisés dans la zone centrolobulaire où l'accumulation des FIs semble concorder avec l'expression des Hsp70i et des Hsp25 alors que dans le foie des animaux contrôles, les FIs sont distribués de façon uniforme dans toutes les cellules. La réorganisation du réseau de kératine dans les mêmes zones que celles contenant Hsp25 et Hsp70i confirme que les Hsps ont un rôle à jouer dans la protection des hépatocytes contre les effets toxiques de l'ACT, ce qui est en accord avec les conclusions de Perng et ses collaborateurs. En effet, ces derniers ont observé qu'après un traitement avec l'ACT, Hsp70i est localisé dans les hépatocytes de la région centrolobulaire contenant les métabolites toxiques de la drogue (Perng *et al.*, 1999a).

Lorsque la localisation des Hsps dans les hépatocytes des souris traitées pendant 4 mois est comparée avec celle des hépatocytes de souris traitées de 1 à 3 mois, une importante différence est observée. La distribution centrolobulaire des Hsps et des FIs, remarquée au cours des 3 premiers mois, est toujours présente après 4 mois de traitement. Cependant, au lieu d'être uniquement distribuées dans le cytoplasme comme précédemment, les Hsp25 et 70i sont surtout localisées au niveau des noyaux ainsi que de la membrane plasmique des cellules étroitement associées à la veine centrale. De plus, certains hépatocytes situés à la périphérie de cette zone centrolobulaire présentent aussi un marquage identique des noyaux et de la membrane plasmique; cependant, celui-

ci est beaucoup moins prononcé. Une des hypothèses envisagées pour expliquer cette nouvelle localisation des Hsps serait que suite à l'accumulation des métabolites toxiques de l'ACT, les hépatocytes de la zone centrolobulaire n'arriveraient plus à circonscrire l'intoxication (Salminen *et al.*, 1997a). Ceux-ci et les hépatocytes en périphérie tenteraient donc, par la production d'Hsps, de stabiliser leur ADN et leur membrane plasmique, des composantes importantes pour le maintien de l'intégrité cellulaire, afin d'éviter que les cellules ne soient trop endommagées par la substance toxique et qu'elles n'entrent en apoptose.

Nos résultats montrent qu'une colocalisation existe entre K8/K18 et Hsp25 ou Hsp70i dans les hépatocytes d'animaux traités. Cette colocalisation est surtout visible lors des 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} mois de traitement. Certains travaux réalisés par une autre équipe de chercheurs sur des cellules astrocytaires et des cellules humaines de carcinome (cancer du sein) en culture ont aussi montré une colocalisation entre les Hsps et les FIs (Perng *et al.*, 1999a). Ceux-ci ont pu démontrer qu'Hsp27 et l' α B-cristalline colocalisaient avec la GFAP et la vimentine dans une lignée de cellules astrocytaires; qu'Hsc70 et la GFAP colocalisaient aussi dans le même type de cellules; et finalement qu'Hsp27 et la protéine de FIs K18 colocalisaient dans les cellules de carcinome. Ces résultats ont été obtenus autant chez les cellules saines que chez les cellules soumises à un stress (choc thermique et cytochalasine D); ils montrent que les Hsps peuvent s'associer avec les protéines de FIs de type I, II et même III, ce qui suggère que ces interactions sont très importantes pour les protéines de FIs. En effet, selon les auteurs de ces études, ces interactions empêcheraient les FIs de perdre leur fonction et protégeraient ceux-ci des interactions non souhaitées résultant de leur proximité (Perng *et al.*, 1999a).

Rappelons que certaines études ont démontré qu'une intoxication chronique par des substances hépatotoxiques comme la GF et le DDC causent l'agrégation de FIs et la formation de CMs (Denk *et al.*, 1975; Yokoo *et al.*, 1982). Ces CMs sont biochimiquement et morphologiquement identiques à ceux développés chez l'humain

lors de pathologies associées au foie comme l'hépatite alcoolique, la cirrhose amérindienne infantile ou la maladie de Wilson (Franke *et al.*, 1979; Cadrin *et al.*, 1990). Plusieurs études ont démontré que les CMs contiennent des K8 et K18 comme principaux constituants (Franke *et al.*, 1979; French, 1981; Kimoff et Huang, 1981; Denk *et al.*, 1982; Ohta *et al.*, 1988; Cadrin *et al.*, 1990; Jensen et Gluud, 1994a).

Contrairement à ce qui a été observé avec la GF dans une autre étude effectuée par notre laboratoire (Fausther *et al.*, 2004), malgré une augmentation marquée de l'expression de la K8, le traitement à l'ACT ne semble pas induire la formation de CMs dans les hépatocytes. Par conséquent, une augmentation de l'expression de K8/K18 n'entraîne pas directement la formation des CMs. Une importante différence dans la réponse au stress entre la présente étude et celle où la GF a été utilisée est que, dans le cas du traitement à l'ACT, Hsp25 et Hsp70i ont été surexprimées dans les cellules tandis que dans le cas du traitement à la GF, seule l'expression d'Hsp70i a été augmentée. La colocalisation qui suggère une association entre les FIs et Hsp70i est probablement aussi importante au cours de ce phénomène que l'augmentation d'Hsp70i elle-même. Ces résultats sont en accord avec les hypothèses de l'équipe de Quinlan qui suggéraient que les sHsps permettraient aux FIs de conserver leur intégrité structurale et préviendraient leur agrégation (Perng *et al.*, 1999a; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999). Hsp25 étant une sHsp, l'importante augmentation de son expression notée dans cette étude laisse supposer qu'elle pourrait avoir un rôle important à jouer dans la prévention de la formation des CMs aux temps de traitement étudiés. Par contre, il est possible qu'un traitement à plus long terme conduise à l'apparition de CMs dans les hépatocytes, les sHsps n'étant pas parvenues à freiner l'intoxication ou encore n'accomplissant pas cette fonction.

3.2 CONCLUSION

Les résultats obtenus supportent l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des Hsp25 et Hsp70i dans les hépatocytes est un mécanisme de protection mis en place par les cellules en vue d'enrayer les effets de l'exposition à certaines substances toxiques. La réorganisation du réseau de FIs dans les mêmes zones contenant Hsp25 et Hsp70i suggère que K8/K18 jouent aussi un rôle dans la protection des hépatocytes contre les effets toxiques de l'ACT. L'augmentation continue de la K8/K18 pendant tout le traitement ferait en sorte que les cellules soient capables de faire face au stress bien que l'expression des Hsps diminue graduellement après le premier mois suivant l'intoxication. Il s'agirait peut être d'un mécanisme d'adaptation au stress. La colocalisation de la K8/K18 et des Hsps dans les hépatocytes suggère que l'interaction entre ces protéines est très importante. Ainsi, les Hsps aideraient au maintien de l'intégrité du réseau de FIs lors de situations pathologiques (Perng *et al.*, 1999a; Quinlan et Van Den Ijssel, 1999). Le fait qu'il n'y ait pas apparition de CMs dans les hépatocytes lors du présent traitement pourrait être la conséquence de l'augmentation de l'expression d'Hsp25 dans les cellules. En effet, puisque cette dernière Hsps n'est pas retrouvée dans l'étude effectuée par Michel Fausther avec la GF (Fausther *et al.*, 2004), il est tentant de croire que cette sHsps pourrait jouer un rôle important dans la prévention de la formation des CMs aux temps de traitement étudiés.

3.3 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Suite à notre étude, plusieurs perspectives de recherche s'ouvrent à nous. Éventuellement nous pourrions réaliser un traitement à plus long terme avec l'ACT pour tenter d'induire la formation de CMs dans les hépatocytes de souris. Aussi, puisque d'autres études effectuées dans notre laboratoire ont démontré qu'une phosphorylation sur certains sites spécifiques des kératines se produit lors d'une intoxication à la GF,

nous pourrions essayer de vérifier s'il y a phosphorylation dans le cas d'un traitement à l'ACT. L'étude de l'apoptose dans le foie pourrait également être une avenue intéressante car certains résultats obtenus récemment dans notre laboratoire laissent entrevoir que la phosphorylation des kératines pourrait précéder ou être associée à l'apoptose des hépatocytes (données non publiées). Puisqu'une colocalisation des kératines et des Hsps est visible dans les hépatocytes par immunofluorescence, il serait aussi intéressant de vérifier si ces protéines sont véritablement associées physiquement dans les cellules. Une immunoprécipitation des kératines permettrait de s'assurer que les Hsps et les kératines coimmunoprécipitent.

3.3.1 Traitement à plus long terme

Lors de notre étude, les temps de traitement utilisés allaient de 1 à 4 mois. Après 4 mois de traitement, bien que le patron d'expression pour Hsp25, Hsp70i et K8/K18 soit différent des 3 premiers mois, il n'y avait toujours pas apparition de CMs dans les hépatocytes comme dans le cas d'une intoxication à la GF ou certaines autres substances hépatotoxiques. Comme mentionné précédemment, on ne peut exclure la possibilité d'une apparition de ces agrégats lors d'un traitement plus long ou à plus forte dose, car tout comme pour la GF, une modification de la K8/K18 dans les cellules était observée. Un traitement à plus long terme ou à plus forte dose serait donc envisageable pour infirmer ou confirmer cette possibilité.

De plus, un traitement à plus long terme avec l'ACT nous permettrait aussi de voir si les hépatocytes entrent dans une phase de récupération après quelques mois comme c'est le cas lors d'un traitement à GF. En effet, après un traitement de 3 mois à la GF, on remarque que les cellules entrent dans une phase de récupération partielle (Cadrin *et al.*, 2000). Pendant cette phase, on peut voir que les hépatocytes retrouvent leur aspect initial, que la distribution de K8/K18 à l'intérieur des cellules ressemble à ce qui est

observé dans le foie des souris contrôles et que le niveau de K8 demeure élevé alors que celui d'Hsp70i diminue légèrement (Cadrin *et al.*, 2000; Fausther *et al.*, 2004).

3.3.2 Phosphorylation

L'étude de la phosphorylation sur les hépatocytes de souris traitées à l'ACT était jusqu'à maintenant une perspective d'avenir intéressante. Cependant, il ne peut plus être question de perspective d'avenir présentement car ces expériences ont été réalisées dernièrement par une étudiante travaillant dans notre laboratoire, Anne-Marie Fortier.

La phosphorylation joue un rôle régulateur important au niveau de diverses protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires essentiels. Les protéines de FIs sont également affectées par cette modification post-traductionnelle (Celis *et al.*, 1985; Chou *et al.*, 1992; Ku et Omary, 1994; Omary *et al.*, 1998; Herrmann *et al.*, 2003). La phosphorylation serait aussi un moyen de défense employé par les cellules contre le stress. En effet, la phosphorylation de K8 sur les sites sérine 79 (Ser79) et Ser436 chez la souris, qui correspondent respectivement aux Ser73 et Ser431 des K8 humaines, a été associée à divers processus tels la mitose, l'apoptose, la réorganisation des FIs et la protection des cellules en situation de stress *in vivo* et *in vitro* (Chou *et al.*, 1992; Liao *et al.*, 1995b; Liao *et al.*, 1997; Omary *et al.*, 1998; Ku *et al.*, 2002; Toivola *et al.*, 2002). Ainsi, on peut penser que l'assemblage et la réorganisation du réseau de FIs dans les cellules sont influencés par des modifications dans le niveau de phosphorylation et dans les sites de phosphorylation des kératines.

Une des hypothèses avancées suite à des études effectuées dans notre laboratoire par Michel Fausther est qu'une modulation de la phosphorylation des kératines pourrait jouer un rôle au cours du développement de maladies hépatiques et être associée à la

formation des CMs dans les hépatocytes (Fausther *et al.*, 2004). Ces travaux ont montré qu'une augmentation de la phosphorylation des K8/K18 se produit dans les hépatocytes suite à un traitement à la GF. Au niveau de la K8 on pouvait noter une augmentation de la phosphorylation au niveau de 2 sites spécifiques, soit Ser73 (la plus grande augmentation) et Ser431 alors que pour la K18, on observait une augmentation de la phosphorylation au site de la Ser33. Ces mêmes sites de phosphorylation ont été étudiés sur des foies de souris ayant été traitées à l'ACT.

Des résultats préliminaires intéressants ont été obtenus lors d'expériences réalisées à l'été 2004. L'utilisation d'un anticorps monoclonal reconnaissant la K8 phosphorylée au site Ser73, soit LJ4, a démontré que les contrôles présentaient quelques cellules marquées qui étaient isolées. Ces cellules sont possiblement des cellules en mitose. Après 1 mois de traitement, le marquage est très augmenté et retrouvé au niveau du cytoplasme. Les cellules marquées sont souvent en doublet ou en amas. La présence de doublet suggère que ces cellules sont en cours de mitose. Pour les autres temps de traitement, le marquage diminue progressivement pour laisser seulement quelques cellules isolées. Cependant, à ces temps de traitement, le marquage ressemble tout de même à ce que l'on peut voir après 1 mois de traitement. Un second anticorps monoclonal pour la K8 reconnaissant le site de la Ser431 phosphorylé, soit 5B3, a été utilisé. Les résultats obtenus avec cet anticorps montraient que cet épitope n'est pas présent dans les hépatocytes et ce, pour tous les temps de traitement ainsi que pour les contrôles. La même intensité de marquage était observée sur toutes les coupes de tissu. Aucune cellule présentant un marquage au niveau du cytoplasme n'a pu être observée.

La détection de la K18 phosphorylée au site de la Ser33 a été effectuée grâce à un anticorps polyclonal, l'anticorps 8250. Dans le foie des animaux contrôles, aucune cellule marquée n'est observée. Après 1 mois de traitement, beaucoup d'hépatocytes sont marqués et ce marquage est observable au niveau du cytoplasme. Les cellules marquées par cet anticorps délimitent très bien les vaisseaux sanguins et les canaux

biliaires. Après 2 mois de traitement, le marquage est beaucoup moins visible et même parfois absent. Les cellules marquées sont surtout des hépatocytes isolés. Après 3 et 4 mois de traitement à l'ACT, on peut observer que le marquage s'est déplacé au niveau du noyau de certaines cellules et qu'il a disparu du cytoplasme; ce type de marquage est non-spécifique.

Les résultats obtenus dans cette dernière étude ne sont pas tout à fait semblables à ceux obtenus lors d'études antérieures (Stumptner *et al.*, 2000; Fausther *et al.*, 2004). Toutefois, comme montré précédemment, une intoxication des souris à l'ACT est associée à une augmentation générale de la phosphorylation de K8 et K18 sur certains sites spécifiques. Ces modifications de la phosphorylation observées dans les hépatocytes influencent sans aucun doute l'assemblage ainsi que la réorganisation du réseau de FIs dans les cellules en vue de protéger celles-ci suite à un stress. Pour compléter l'étude impliquant l'ACT, il serait possible de tenter d'étudier la phosphorylation des kératines à d'autres sites particuliers. En effet, chez l'humain, cinq sites de phosphorylation ont été caractérisés au niveau des hépatocytes, soit Ser23, Ser73 et Ser431 pour la K8 et Ser 33 et Ser52 pour la K18 (Omary *et al.*, 1998) alors que l'étude effectuée n'en a testé que trois (Ser73, Ser431 et Ser33). Il existe potentiellement 61 sites de phosphorylation sur la K8 et 37 sites sur la K18 chez la souris (Omary *et al.*, 1998), il serait donc intéressant de pousser cette étude de la phosphorylation plus loin. De plus, bien que la sérine soit le résidu majoritairement phosphorylé au niveau des kératines, on peut aussi retrouver de la phosphorylation au niveau d'autres résidus comme la thréonine ou la tyrosine (Oshima, 1982; Steinert, 1988; Omary *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1999). Ainsi, ces sites potentiels de phosphorylation pourraient être des pistes intéressantes à explorer pour comprendre comment les kératines protègent les hépatocytes contre les stress toxiques.

3.3.3 Apoptose

Une étude *in vivo* réalisée, par la méthode TUNEL, sur des lignées de souris FVB/n, déficientes en K8, a montré la présence d'Hsp70i en grande quantité dans les hépatocytes en apoptose (données non-publiées). Les résultats obtenus lors de la présente étude montraient une importante augmentation d'Hsp70i dans les hépatocytes de souris traitées à l'ACT. Il serait donc intéressant de déterminer si une relation existe entre Hsp70i et l'apoptose dans ce système.

3.3.4 Protéines associées aux kératines

Dans la poursuite de ce travail, des analyses biochimiques par immunoprécipitation seraient envisageables puisque les résultats obtenus lors de la présente étude montraient une colocalisation de certaines Hsps et de la K8/K18 par immunofluorescence. L'immunoprécipitation est une technique permettant, grâce à un anticorps approprié, de faire précipiter une protéine d'intérêt ainsi que toutes les protéines qui lui sont associées. Ainsi, en faisant précipiter la K8 il serait possible d'évaluer l'association de certaines protéines avec les FIs. Comme la régulation de la fonction des kératines semble liée à leur association avec d'autres protéines, l'immunoprécipitation permettrait de déterminer si les kératines et les Hsps sont réellement associées physiquement dans les hépatocytes. Nous pourrions aussi déterminer si des protéines qui jouent un rôle dans l'apoptose sont directement associées aux kératines dans le foie. De plus, ce type d'expérience pourrait aussi faire en sorte de détecter d'autres types de protéines associées à la K8 ou aux Hsps telles que des protéines impliquées dans les mécanismes de détoxification.

3.3.5 Études *in vivo* sur un modèle humain

Finalement, des études *in vivo* chez l'être humain pourraient aussi être réalisées. En obtenant des biopsies hépatiques de patients intoxiqués à l'ACT il serait possible de vérifier les hypothèses soulevées par la présente étude. Si les résultats sont positifs, ils permettraient éventuellement de développer des tests permettant de révéler de façon plus générale la toxicité de composés suspectés être hépatotoxiques.

Les connaissances actuelles concernant le fonctionnement des FIs sont encore très sommaires. Plus les recherches apporteront de nouvelles données, plus il sera possible d'améliorer nos connaissances à propos de la compréhension du fonctionnement des kératines et, à plus grande échelle, des protéines de FIs dans la cellule. Ainsi, ces connaissances permettront peut être, dans un avenir plus ou moins rapproché, d'offrir de nouvelles thérapies efficaces pour plusieurs maladies hépatiques impliquant les FIs.

RÉFÉRENCES

Agashe, V. R. et Hartl, F. U. 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. Semin Cell Dev Biol, 11: 15-25.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell (4ème édition ed.). NY, USA: Garland Science.

Al-Chalabi, A. et Miller, C. C. 2003. Neurofilaments and neurological disease. Bioessays, 25: 346-55.

Alizadeh, A., Clark, J., Seeberger, T., Hess, J., Blankenship, T., et FitzGerald, P. G. 2004. Characterization of a mutation in the lens-specific CP49 in the 129 strain of mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci, 45: 884-91.

Association des pharmaciens du Canada (Ed.). 2003. Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques: L'Association des pharmaciens du Canada.

Avila, J. 1992. Microtubule functions. Life Sci, 50: 327-34.

Bahr, G. M., Rook, G. A., al-Saffar, M., Van Embden, J., Stanford, J. L., et Behbehani, K. 1988a. Antibody levels to mycobacteria in relation to HLA type: evidence for non-HLA-linked high levels of antibody to the 65 kD heat shock protein of *M. bovis* in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol, 74: 211-5.

Bahr, G. M., Rook, G. A., Shahin, A., Stanford, J. L., Sattar, M. I., et Behbehani, K. 1988b. HLA-DR-associated isotype-specific regulation of antibody levels to mycobacteria in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol, 72: 26-31.

Bartolone, J. B., Birge, R. B., Bulera, S. J., Bruno, M. K., Nishanian, E. V., Cohen, S. D., et Khairallah, E. A. 1992. Purification, antibody production, and partial amino acid sequence of the 58-kDa acetaminophen-binding liver proteins. Toxicol Appl Pharmacol, 113: 19-29.

Bergman, K., Muller, L., et Teigen, S. W. 1996. Series: current issues in mutagenesis and carcinogenesis, No. 65. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. Mutat Res, 349: 263-88.

Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizberea, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D., et Schwartz, K. 1999. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet, 21: 285-8.

Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., et Garrido, C. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol, 2: 645-52.

Bulera, S. J., Birge, R. B., Cohen, S. D., et Khairallah, E. A. 1995. Identification of the mouse liver 44-kDa acetaminophen-binding protein as a subunit of glutamine synthetase. Toxicol Appl Pharmacol, 134: 313-20.

Cadrin, M., Anderson, N. M., Aasheim, L. H., Kawahara, H., Franks, D. J., et French, S. W. 1995. Modifications in cytokeratin and actin in cultured liver cells derived from griseofulvin-fed mice. Lab Invest, 72: 453-60.

Cadrin, M., Brown, D. L., et Reuhl, K. R. 1993. Effect of environmental toxicants on the cytoskeleton. In A. Press (Ed.), Handbook of Hazardous Materials: 233-239.

Cadrin, M., Hovington, H., Marceau, N., et McFarlane-Anderson, N. 2000. Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver. J Hepatol, 33: 199-207.

Cadrin, M., Kawahara, H., Ohta, M., Katsuma, Y., Marceau, N., et French, S. W. 1990. Mallory bodies in hepatomas and hyperplastic nodules: in vitro and in vivo studies. Prog Clin Biol Res, 331: 231-48.

Cadrin, M. et Martinoli, M. G. 1995. Alterations of intermediate filaments in various histopathological conditions. Biochem Cell Biol, 73: 627-34.

Capetanaki, Y., Smith, S., et Heath, J. P. 1989. Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. J Cell Biol, 109: 1653-64.

Carlier, M. F. 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. J Biol Chem, 266: 1-4.

Carter, J. M., Hutcheson, A. M., et Quinlan, R. A. 1995. In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115: coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin. Exp Eye Res, 60: 181-92.

Celis, J. E., Fey, S. J., Larsen, P. M., et Celis, A. 1985. Preferential phosphorylation of keratins and vimentin during mitosis in normal and transformed human amnion cells. Ann N Y Acad Sci, 455: 268-81.

Chan, H. Y., Warrick, J. M., Gray-Board, G. L., Paulson, H. L., et Bonini, N. M. 2000. Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in Drosophila. Hum Mol Genet, 9: 2811-20.

Charette, S. J., Lavoie, J. N., Lambert, H., et Landry, J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. Mol Cell Biol, 20: 7602-12.

Chen, L., Lee, L., Kudlow, B. A., Dos Santos, H. G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E. G., Garg, A., Hanson, N. B., Martin, G. M., Mian, I. S., Kennedy, B. K., et Oshima, J. 2003. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. Lancet, 362: 440-5.

Chen, T. S., Richie, J. P., Jr., et Lang, C. A. 1990. Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification. Drug Metab Dispos, 18: 882-7.

Chou, C. F., Smith, A. J., et Omary, M. B. 1992. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. J Biol Chem, 267: 3901-6.

Coulombe, P. A., Hutton, M. E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A. S., et Fuchs, E. 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. Cell, 66: 1301-11.

Coulombe, P. A. et Omary, M. B. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Curr Opin Cell Biol, 14: 110-22.

Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T., et Zoghbi, H. Y. 1998. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. Nat Genet, 19: 148-54.

Czar, M. J., Welsh, M. J., et Pratt, W. B. 1996. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. Eur J Cell Biol, 70: 322-30.

Davidson, D. G. et Eastham, W. N. 1966. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. Br Med J, 5512: 497-9.

De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Le Merrer, M., et Levy, N. 2003. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. Science, 300: 2055.

De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J. M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepietowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C. L., Grid, D., et Levy, N. 2002. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. Am J Hum Genet, 70: 726-36.

Denk, H., Gschnait, F., et Wolff, K. 1975. Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. Lab Invest, 32: 773-6.

Denk, H., Krepler, R., Lackinger, E., Artlieb, U., et Franke, W. W. 1982. Immunological and biochemical characterization of the keratin-related component of Mallory bodies: a pathological pattern of hepatocytic cytokeratins. Liver, 2: 165-75.

Draganov, P., Durrence, H., Cox, C., et Reuben, A. 2000. Alcohol-acetaminophen syndrome. Even moderate social drinkers are at risk. Postgrad Med, 107: 189-95.

Dunia, I., Pieper, F., Manenti, S., van de Kemp, A., Devilliers, G., Benedetti, E. L., et Bloemendal, H. 1990. Plasma membrane-cytoskeleton damage in eye lenses of transgenic mice expressing desmin. Eur J Cell Biol, 53: 59-74.

Ellis, J. 1987. Proteins as molecular chaperones. Nature, 328: 378-9.

Evgrafov, O. V., Mersiyanova, I., Irobi, J., Van Den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C. L., Schagina, O., Verpoorten, N., Van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J. J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R. K., Gettemans, J., Robberecht, W., De Jonghe, P., et Timmerman, V. 2004. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. Nat Genet, 36: 602-6.

Farrell, S. E.; "Toxicity, Acetaminophen"; www.emedecine.com, (2002).

Fausther, M., Villeneuve, L., et Cadrin, M. 2004. Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. Comp Hepatol, 3: 5.

Feder, M. E. et Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol, 61: 243-82.

Feng, L., Zhou, X., Liao, J., et Omary, M. B. 1999. Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. J Cell Sci, 112 (Pt 13): 2081-90.

Fostinis, Y., Theodoropoulos, P. A., Gravanis, A., et Stournaras, C. 1992. Heat shock protein HSP90 and its association with the cytoskeleton: a morphological study. Biochem Cell Biol, 70: 779-86.

Franke, W. W., Denk, H., Schmid, E., Osborn, M., et Weber, K. 1979. Ultrastructural, biochemical, and immunologic characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice. Fimbriated rods of filaments containing prekeratin-like polypeptides. Lab Invest, 40: 207-20.

Franke, W. W., Schmid, E., Schiller, D. L., Winter, S., Jarasch, E. D., Moll, R., Denk, H., Jackson, B. W., et Illmensee, K. 1982. Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 46 Pt 1: 431-53.

French S.W., O. T., Swierenga S.H.H., Marceau N. 1987. The cytoskeleton of hepatocytes in health and disease. In Edited by Faber E (Ed.), Pathogenesis of liver disease: 95-112. Baltimore, Williams & Wilkins.: Phillips MJ.

French, S. W. 1981. The Mallory body: structure, composition, and pathogenesis. Hepatology, 1: 76-83.

Fuchs, E. et Cleveland, D. W. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science, 279: 514-9.

Fuchs, E., Coulombe, P., Cheng, J., Chan, Y. M., Hutton, E., Syder, A., Degenstein, L., Yu, Q. C., Letai, A., et Vassar, R. 1994. Genetic bases of epidermolysis bullosa simplex and epidermolytic hyperkeratosis. J Invest Dermatol, 103: 25S-30S.

Fuchs, E. et Coulombe, P. A. 1992. Of mice and men: genetic skin diseases of keratin. Cell, 69: 899-902.

Fuchs, E., Tyner, A. L., Giudice, G. J., Marchuk, D., RayChaudhury, A., et Rosenberg, M. 1987. The human keratin genes and their differential expression. Curr Top Dev Biol, 22: 5-34.

Fuchs, E. et Weber, K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. Annu Rev Biochem, 63: 345-82.

Furukawa, R. et Fechheimer, M. 1997. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. Int Rev Cytol, 175: 29-90.

Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A. P., Mehlen, P., et Solary, E. 1998. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. Cancer Res, 58: 5495-9.

Geisler, N. et Weber, K. 1982. The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. Embo J, 1: 1649-56.

Giese, K. C. et Vierling, E. 2004. Mutants in a small heat shock protein that affect the oligomeric state: analysis and allele-specific suppression. J Biol Chem.

Goebel, H. H. et Bornemann, A. 1993. Desmin pathology in neuromuscular diseases. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 64: 127-35.

Goldfarb, L. G., Park, K. Y., Cervenakova, L., Gorokhova, S., Lee, H. S., Vasconcelos, O., Nagle, J. W., Semino-Mora, C., Sivakumar, K., et Dalakas, M. C. 1998. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. Nat Genet, 19: 402-3.

Halmes, N. C., Hinson, J. A., Martin, B. M., et Pumford, N. R. 1996. Glutamate dehydrogenase covalently binds to a reactive metabolite of acetaminophen. Chem Res Toxicol, 9: 541-6.

Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature, 381: 571-9.

Hartl, F. U. et Martin, J. 1995. Molecular chaperones in cellular protein folding. Curr Opin Struct Biol, 5: 92-102.

Hayes, S. A. et Dice, J. F. 1996. Roles of molecular chaperones in protein degradation. J Cell Biol, 132: 255-8.

Herrmann, H. et Aebi, U. 1998. Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. Subcell Biochem, 31: 319-62.

Herrmann, H. et Aebi, U. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. Curr Opin Cell Biol, 12: 79-90.

Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U., et Magin, T. M. 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. Int Rev Cytol, 223: 83-175.

Herrmann, H., Strelkov, S. V., Feja, B., Rogers, K. R., Brettel, M., Lustig, A., Haner, M., Parry, D. A., Steinert, P. M., Burkhard, P., et Aebi, U. 2000. The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. J Mol Biol, 298: 817-32.

Ho, C. L. et Liem, R. K. 1996. Intermediate filaments in the nervous system: implications in cancer. Cancer Metastasis Rev, 15: 483-97.

Hutchison, C. J., Alvarez-Reyes, M., et Vaughan, O. A. 2001. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? J Cell Sci, 114: 9-19.

Hutter, H., Zatloukal, K., Winter, G., Stumptner, C., et Denk, H. 1993. Disturbance of keratin homeostasis in griseofulvin-intoxicated mouse liver. Lab Invest, 69: 576-82.

Iwaki, T., Iwaki, A., Tateishi, J., et Goldman, J. E. 1994. Sense and antisense modification of glial alpha B-crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. J Cell Biol, 125: 1385-93.

Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R. K., et Goldman, J. E. 1989. Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. Cell, 57: 71-8.

Jaattela, M. 1995. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. Int J Cancer, 60: 689-93.

Jaattela, M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. Ann Med, 31: 261-71.

Jensen, K. et Gluud, C. 1994a. The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). Hepatology, 20: 1061-77.

Kachi, K., Cadrin, M., et French, S. W. 1993. Synthesis of Mallory body, intermediate filament, and microfilament proteins in liver cell primary cultures. An electron microscopic autoradiography assay. Lab Invest, 68: 71-81.

Kakizuka, A. 1998. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? Trends Genet, 14: 396-402.

Kappe, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. A., et de Jong, W. W. 2003. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. Cell Stress Chaperones, 8: 53-61.

Kappe, G., Verschuure, P., Philipsen, R. L., Staalduinen, A. A., Van de Boogaart, P., Boelens, W. C., et De Jong, W. W. 2001. Characterization of two novel human small heat shock proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. Biochim Biophys Acta, 1520: 1-6.

Kato, K., Ito, H., et Inaguma, Y. 2002. Expression and phosphorylation of mammalian small heat shock proteins. Prog Mol Subcell Biol, 28: 129-50.

Kato, K., Shinohara, H., Kurobe, N., Goto, S., Inaguma, Y., et Ohshima, K. 1991. Immunoreactive alpha A crystallin in rat non-lenticular tissues detected with a sensitive immunoassay method. Biochim Biophys Acta, 1080: 173-80.

Kawanishi, K., Shiozaki, H., Doki, Y., Sakita, I., Inoue, M., Yano, M., Tsujinaka, T., Shamma, A., et Monden, M. 1999. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer, 85: 1649-57.

Kazemi-Esfarjani, P. et Benzer, S. 2000. Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. Science, 287: 1837-40.

Kimoff, R. J. et Huang, S. 1981. Immunocytochemical and immunoelectron microscopic studies on Mallory bodies. Lab Invest, 45: 491-503.

Kirfel, J., Magin, T. M., et Reichelt, J. 2003. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. Cell Mol Life Sci, 60: 56-71.

Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., et Yahara, I. 1986. Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, 83: 8054-8.

Krahenbuhl, S. 1999. Acarbose and acetaminophen--a dangerous combination? Hepatology, 29: 285-7.

Ku, N. O., Azhar, S., et Omary, M. B. 2002. Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation. J Biol Chem, 277: 10775-82.

Ku, N. O., Michie, S., Oshima, R. G., et Omary, M. B. 1995. Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. J Cell Biol, 131: 1303-14.

Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L., Oshima, R. G., et Omary, M. B. 1996. Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant. J Clin Invest, 98: 1034-46.

Ku, N. O. et Omary, M. B. 1994. Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells. Exp Cell Res, 211: 24-35.

Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M., et Omary, M. B. 1999. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. Am J Physiol, 277: G1108-37.

Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M., et Landry, J. 1993. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. J Biol Chem, 268: 3420-9.

Lee, M. K. et Cleveland, D. W. 1996. Neuronal intermediate filaments. Annu Rev Neurosci, 19: 187-217.

Lefebvre, L. 1999. Bulletin d'information toxicologique, 15.

Leicht, B. G., Biessmann, H., Palter, K. B., et Bonner, J. J. 1986. Small heat shock proteins of *Drosophila* associate with the cytoskeleton. Proc Natl Acad Sci U S A, 83: 90-4.

Liang, P. et MacRae, T. H. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. J Cell Sci, 110 (Pt 13): 1431-40.

Liao, J., Ku, N. O., et Omary, M. B. 1997. Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. J Biol Chem, 272: 17565-73.

Liao, J., Lowthert, L. A., Ghori, N., et Omary, M. B. 1995a. The 70-kDa heat shock proteins associate with glandular intermediate filaments in an ATP-dependent manner. J Biol Chem, 270: 915-22.

Liao, J., Lowthert, L. A., Ku, N. O., Fernandez, R., et Omary, M. B. 1995b. Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. J Cell Biol, 131: 1291-301.

Lindquist, S. et Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet, 22: 631-77.

Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D. M., Murphey, W., Lovrien, E. W., et Weleber, R. G. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. Hum Mol Genet, 7: 471-4.

Loranger, A., Duclos, S., Grenier, A., Price, J., Wilson-Heiner, M., Baribault, H., et Marceau, N. 1997. Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. Am J Pathol, 151: 1673-83.

Lores Arnaiz, S., Llesuy, S., Cutrin, J. C., et Boveris, A. 1995. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. Free Radic Biol Med, 19: 303-10.

Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M., et Mayer, R. J. 1992. alpha B crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. J Pathol, 166: 61-8.

Macejak, D. G. et Luftig, R. B. 1991. Stabilization of actin filaments at early times after adenovirus infection and in heat-shocked cells. Virus Res, 19: 31-45.

Magin, T. M., Schroder, R., Leitgeb, S., Wanninger, F., Zatloukal, K., Grund, C., et Melton, D. W. 1998. Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. J Cell Biol, 140: 1441-51.

Martin, J. et Hartl, F. U. 1997. Chaperone-assisted protein folding. Curr Opin Struct Biol, 7: 41-52.

Maruyama, H. et Williams, G. M. 1988. Hepatotoxicity of chronic high dose administration of acetaminophen to mice. A critical review and implications for hazard assessment. Arch Toxicol, 62: 465-9.

Michaud, S. et Tanguay, R. M. 2003. Expression of the Hsp23 chaperone during *Drosophila* embryogenesis: association to distinct neural and glial lineages. BMC Dev Biol, 3: 9.

Minota, S., Cameron, B., Welch, W. J., et Winfield, J. B. 1988a. Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. J Exp Med, 168: 1475-80.

Minota, S., Koyasu, S., Yahara, I., et Winfield, J. 1988b. Autoantibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest, 81: 106-9.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., et Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell, 31: 11-24.

Morange, M. 2000. Protéines chaperons. Médecine/Sciences, 16: 630-634.

Morimitsu, Y., Sugihara, N., et Furuno, K. 2004. Inhibitory effect of flavonoids on sulfo- and glucurono-conjugation of acetaminophen in rat cultured hepatocytes and liver subcellular preparations. Biol Pharm Bull, 27: 714-7.

Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N., et Cotto, J. J. 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. Essays Biochem, 32: 17-29.

Mounier, N. et Arrigo, A. P. 2002. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? Cell Stress Chaperones, 7: 167-76.

Munoz-Marmol, A. M., Strasser, G., Isamat, M., Coulombe, P. A., Yang, Y., Roca, X., Vela, E., Mate, J. L., Coll, J., Fernandez-Figueras, M. T., Navas-Palacios, J. J., Ariza, A., et Fuchs, E. 1998. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 11312-7.

Nicholl, I. D. et Quinlan, R. A. 1994. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. Embo J, 13: 945-53.

Nollen, E. A. et Morimoto, R. I. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. J Cell Sci, 115: 2809-16.

Ohta, M., Marceau, N., Perry, G., Manetto, V., Gambetti, P., Autilio-Gambetti, L., Metzuzals, J., Kawahara, H., Cadrin, M., et French, S. W. 1988. Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory bodies of hepatocytes. Lab Invest, 59: 848-56.

Omary, M. B. et Ku, N. O. 1997. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. Hepatology, 25: 1043-8.

Omary, M. B., Ku, N. O., Liao, J., et Price, D. 1998. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. Subcell Biochem, 31: 105-40.

Omary, M. B., Ku, N. O., et Toivola, D. M. 2002. Keratins: guardians of the liver. Hepatology, 35: 251-7.

Oshima, R. G. 1982. Developmental expression of murine extra-embryonic endodermal cytoskeletal proteins. J Biol Chem, 257: 3414-21.

Parsell, D. A. et Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet, 27: 437-96.

Pelham, H. R. 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell, 46: 959-61.

Perng, M. D., Cairns, L., van den, I. P., Prescott, A., Hutcheson, A. M., et Quinlan, R. A. 1999a. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. J Cell Sci, 112 (Pt 13): 2099-112.

Perng, M. D., Muchowski, P. J., van Den, I. P., Wu, G. J., Hutcheson, A. M., Clark, J. I., et Quinlan, R. A. 1999b. The cardiomyopathy and lens cataract mutation in alphaB-crystallin alters its protein structure, chaperone activity, and interaction with intermediate filaments in vitro. J Biol Chem, 274: 33235-43.

Phillips J., S. P. 1988. The cytoskeleton of the hepatocyte: organisation, relationships, and pathology. In J. W. Edited by Arias IM, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. (Ed.), The liver: Biology and pathobiology: 11-27. New York: Raven press, Ltd.

Prescott, L. F., Roscoe, P., Wright, N., et Brown, S. S. 1971. Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdosage. Lancet, 1: 519-22.

Pumford, N. R., Halmes, N. C., Martin, B. M., Cook, R. J., Wagner, C., et Hinson, J. A. 1997. Covalent binding of acetaminophen to N-10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in mice. J Pharmacol Exp Ther, 280: 501-5.

Pumford, N. R., Martin, B. M., et Hinson, J. A. 1992. A metabolite of acetaminophen covalently binds to the 56 kDa selenium binding protein. Biochem Biophys Res Commun, 182: 1348-55.

Quinlan, R. et Van Den Ijssel, P. 1999. Fatal attraction: when chaperone turns harlot. Nat Med, 5: 25-6.

Reicks, M., Calvert, R. J., et Hathcock, J. N. 1988. Effects of prolonged acetaminophen ingestion and dietary methionine on mouse liver glutathione. Drug Nutr Interact, 5: 351-63.

Reicks, M. M. et Hathcock, J. N. 1984. Effects of dietary methionine and ethanol on acetaminophen hepatotoxicity in mice. Drug Nutr Interact, 3: 43-51.

Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experimentia, 18: 571-573.

Salminen, W. F., Jr., Roberts, S. M., Fenna, M., et Voellmy, R. 1997. Heat shock protein induction in murine liver after acute treatment with cocaine. Hepatology, 25: 1147-53.

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R., et Roberts, S. M. 1996. Induction of hsp 70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. Toxicol Appl Pharmacol, 141: 117-23.

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R., et Roberts, S. M. 1997a. Differential heat shock protein induction by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. J Pharmacol Exp Ther, 282: 1533-40.

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R., et Roberts, S. M. 1997b. Protection against hepatotoxicity by a single dose of amphetamine: the potential role of heat shock protein induction. Toxicol Appl Pharmacol, 147: 247-58.

Salminen, W. F., Jr., Voellmy, R., et Roberts, S. M. 1998. Effect of N-acetylcysteine on heat shock protein induction by acetaminophen in mouse liver. J Pharmacol Exp Ther, 286: 519-24.

Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. J Biol Chem, 265: 12111-4.

Sharp, F. R., Massa, S. M., et Swanson, R. A. 1999. Heat-shock protein protection. Trends Neurosci, 22: 97-9.

Slavotinek, A. M. et Biesecker, L. G. 2001. Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. Trends Genet, 17: 528-35.

Steinert, P. M. 1988. The dynamic phosphorylation of the human intermediate filament keratin 1 chain. J Biol Chem, 263: 13333-9.

Steinert, P. M. et Roop, D. R. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annu Rev Biochem, 57: 593-625.

Stumptner, C., Omary, M. B., Fickert, P., Denk, H., et Zatloukal, K. 2000. Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a mallory body mouse model. Am J Pathol, 156: 77-90.

Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Wayne, M. M., Tsui, S. K., Yoshida, S., et Ohno, S. 2000. Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. J Biol Chem, 275: 1095-104.

Sumioka, I., Matsura, T., Kai, M., et Yamada, K. 2004. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. Life Sci, 74: 2551-61.

Tissieres, A., Mitchell, H. K., et Tracy, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J Mol Biol, 84: 389-98.

Toivola, D. M., Baribault, H., Magin, T., Michie, S. A., et Omary, M. B. 2000. Simple epithelial keratins are dispensable for cytoprotection in two pancreatitis models. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 279: G1343-54.

Toivola, D. M., Omary, M. B., Ku, N. O., Peltola, O., Baribault, H., et Eriksson, J. E. 1998. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity. Hepatology, 28: 116-28.

Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S., et Omary, M. B. 2002. Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. Mol Biol Cell, 13: 1857-70.

Tosi, P., Visani, G., Ottaviani, E., Gibellini, D., Pellacani, A., et Tura, S. 1997. Reduction of heat-shock protein-70 after prolonged treatment with retinoids: biological and clinical implications. Am J Hematol, 56: 143-50.

Tsoufka, G., Rook, G. A., Bahr, G. M., Sattar, M. A., Behbehani, K., Young, D. B., Mehlert, A., Van-Embden, J. D., Hay, F. C., Isenberg, D. A., et al. 1989a. Elevated IgG antibody levels to the mycobacterial 65-kDa heat shock protein are characteristic of patients with rheumatoid arthritis. Scand J Immunol, 30: 519-27.

Tsoufka, G., Rook, G. A., Van-Embden, J. D., Young, D. B., Mehlert, A., Isenberg, D. A., Hay, F. C., et Lydyard, P. M. 1989b. Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, 48: 118-23.

Valiron, O., Caudron, N., et Job, D. 2001. Microtubule dynamics. Cell Mol Life Sci, 58: 2069-84.

van den Ijssel, P., Norman, D. G., et Quinlan, R. A. 1999. Molecular chaperones: small heat shock proteins in the limelight. Curr Biol, 9: R103-5.

Vassar, R., Coulombe, P. A., Degenstein, L., Albers, K., et Fuchs, E. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. Cell, 64: 365-80.

Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M. C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J. M., Paulin, D., et Fardeau, M. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. Nat Genet, 20: 92-5.

Walter, S. et Buchner, J. 2002. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. Angew Chem Int Ed Engl, 41: 1098-113.

Weller, N. K. 1988. A 70 kDa microtubule-associated protein in NIL8 cells comigrates with the 70 kDa heat shock protein. Biol Cell, 63: 307-17.

Whitley, D., Goldberg, S. P., et Jordan, W. D. 1999. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. J Vasc Surg, 29: 748-51.

Winfield, J. B. 1989. Stress proteins, arthritis, and autoimmunity. Arthritis Rheum, 32: 1497-504.

Wisniewski, T. et Goldman, J. E. 1998. Alpha B-crystallin is associated with intermediate filaments in astrocytoma cells. Neurochem Res, 23: 385-92.

Yamada, S., Wirtz, D., et Coulombe, P. A. 2002. Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. Mol Biol Cell, 13: 382-91.

Yokoo, H., Harwood, T. R., Racker, D., et Arak, S. 1982. Experimental production of Mallory bodies in mice by diet containing 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. Gastroenterology, 83: 109-13.

Yoon, K. H., Yoon, M., Moir, R. D., Khuon, S., Flitney, F. W., et Goldman, R. D. 2001. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. J Cell Biol, 153: 503-16.

Zhao, P. et Slattery, J. T. 2002. Effects of ethanol dose and ethanol withdrawal on rat liver mitochondrial glutathione: implication of potentiated acetaminophen toxicity in alcoholics. Drug Metab Dispos, 30: 1413-7.